



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Caracterización molecular de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Jeanett Zenobia MONTES CJUNO

ASESORES

Amparo Iris ZA VALETA PESANTES

Pamela Elizabeth CANALES MORMONTOY

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Montes J. Caracterización molecular de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Caracterización molecular de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

JEANETT ZENOBIA MONTES CJUNO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Dieciocho (18)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 31 de octubre de 2018

Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Presidente

Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar
Miembro

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Miembro

Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo
Miembro



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Ir. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe
<http://farmacia.unmsm.edu.pe>

Dedico este trabajo a la persona más valiosa que he tenido en mi vida, por su gran apoyo incondicional, por hacer de mí una persona perseverante, responsable, honesta y sencilla, mi agradecimiento infinito a mi madre Agustina Cjuno Huamán.

Agradecimientos

A mi alma máter la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, por brindarme una educación de calidad.

A mis compañeros de la promoción ingresante 2011 con quienes compartí grandes experiencias, vivencias positivas, emociones, alegrías, incertidumbres, carcajadas, y sobre todo por la unión y el apoyo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, lugar donde se ejecutó la presente investigación.

Agradecimientos especiales

A la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes, por brindarme la confianza en desarrollar el presente trabajo de investigación, por sus sabias palabras o aconsejarme y anhelar que todos seamos profesionales de alto nivel que dejemos huella por doquier.

A la Mg. Pamela Elizabeth Canales Mormontoy, por el gran apoyo brindado en la realización de este trabajo y por su amistad sincera.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE ANEXOS	11
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Objetivo General	18
1.2 Objetivos Específicos	18
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 Ambientes hipersalinos	19
2.2 Ambientes hipersalinos en el Perú.....	21
2.2.1 Salinas de Chilca	21
2.2.2 Salinas de Pilluana.....	21
2.2.3 Salinas de Maras	21
2.3 Bacterias de ambientes hipersalinos	23
2.3.1 Mecanismos de adaptación	24
2.3.1.1 <i>Salt-in</i>	24
2.3.1.2 <i>Salt-out</i>	26
2.4 L-asparaginasa bacteriana.....	28
2.4.1 Características generales.....	28
2.4.2 Capacidad hidrolítica.....	28
2.4.3 Tipos comerciales de L-asparaginasa	29
2.4.4 Aplicaciones biotecnológicas	31
2.4.4.1 Acción antineoplásica.....	31
2.4.4.2 Disminución de acrilamida en alimentos procesados por calor.....	33
2.4.4.3 Obtención de aminoácidos.....	34
2.4.5 Fuentes de L-asparaginasa con novedosas propiedades inmunológicas.....	35
2.4.5.1 <i>Phaseolus vulgaris</i>	35
2.4.5.2 <i>Aspergillus tamaraii</i>	36
2.4.5.3 Bacterias de ambientes salinos	36
2.4.6 Bacterias halófilas y halotolerantes productoras de L- asparaginasa	38
2.5 Caracterización molecular bacteriana.....	39
2.5.1 Técnicas para la caracterización molecular de bacterias	40
2.5.1.1 Polymerase chain reaction (PCR).....	40
2.5.1.2 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	41
2.5.2 Secuenciación de los genes ribosómicos 16S.....	42

2.5.3	Análisis bioinformático	42
2.5.3.1	BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	42
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1	Aislados bacterianos	44
3.2	Selección de bacterias con actividad L-asparaginasa	44
3.3	Caracterización fenotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa	46
3.3.1	Identificación microscópica.....	46
3.3.2	Pruebas fisiológicas	47
3.3.2.1	Tolerancia a temperatura, pH y concentración salina.....	47
3.3.3	Pruebas nutricionales.....	47
3.3.4	Pruebas hidrolíticas	47
3.3.4.1	Actividad celulolítica.....	47
3.3.4.2	Actividad amilolítica	48
3.3.4.3	Actividad proteolítica	48
3.3.4.4	Actividad lipolítica	48
3.3.4.5	Producción de DNAsa	48
3.3.5	Pruebas bioquímicas	49
3.3.5.1	Prueba de catalasa.....	49
3.3.5.2	Producción H ₂ S y gas	49
3.3.5.3	Prueba de fermentación y oxidación de glucosa.....	49
3.3.6	Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	50
3.4	Caracterización genotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa.....	50
3.4.1	Extracción de ADN genómico.....	50
3.4.1.1	Lisis	50
3.4.1.2	Purificación.....	50
3.4.1.3	Precipitación	51
3.4.2	Amplificación de los genes ribosómicos 16S	51
3.4.3	Secuenciación de los genes ribosómicos 16S y análisis bioinformático	52
4.	RESULTADOS	53
4.1	Selección de bacterias con actividad L-asparaginasa	53
4.2	Caracterización fenotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa	56
4.2.1	Pruebas fisiológicas	56
4.2.2	Pruebas nutricionales.....	60
4.2.3	Pruebas hidrolíticas	62
4.2.4	Pruebas bioquímicas y microbiológicas	63
4.2.5	Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	65
4.3	Caracterización genotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa.....	66
4.3.1	Extracción de ADN genómico.....	66
4.3.2	Amplificación de los genes ribosómicos 16S	66

4.3.3	Secuenciación de los genes ribosómicos 16S y análisis bioinformático	67
5.	DISCUSIÓN.....	69
6.	CONCLUSIONES	80
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	ANEXO N° 1.....	89
	ANEXO N° 2.....	90
	ANEXO N° 3.....	91
	ANEXO N° 4.....	92

ABREVIATURAS

g : Gramo

μL : Microlitro

ADN : Ácido Desoxirribonucleico

ARN : Ácido Ribonucleico

PCR : Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

SW : Sea water (Agua de sales)

mm : Milímetro

mM : Milimolar

pb : Pares de Bases

LLA : Leucemia Linfocítica aguda

m.o. : microorganismos

PBS : Phosphate Buffered Saline (Buffer fosfato salino)

TSE : Tris / Saline (sodium chloride) / EDTA

SDS : Dodecil Sulfato de sodio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Mecanismo *Salt-in* en microorganismos bacterianos halófilos.

Figura N° 2. Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y halotolerantes.

Figura N° 3. Mecanismo de la reacción catalítica de la L-asparaginasa. Las flechas discontinuas muestran ataque nucleófilo.

Figura N° 4. Muerte celular de la célula linfoblástica.

Figura N° 5. Pasos del ciclo de PCR.

Figura N° 6. Escala de tonalidades del rojo de fenol en medio alcalino.

Figura N° 7. Zonas de hidrólisis de L-asparagina en el medio M-9 modificado por *E. coli* y *B.subtilis*.

Figura N° 8. Medio M-9 modificado con zonas de hidrólisis de L-asparagina de los aislados M74, M68, M67 y M84.

Figura N° 9. Porcentaje de aislados de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca distribuidas por grado de hidrólisis de L-asparagina.

Figura N° 10. Tonalidades de coloración según grado de hidrólisis de L-asparagina de los aislados de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Figura N° 11. Distribución de los perfiles fenotípicos de asimilación de azúcares de las bacterias aisladas de ambientes salinos.

Figura N° 12. Actividad hidrolítica de diferentes sustratos por bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Figura N° 13. Gel de agarosa con ADN genómico extraído de aislados de Pilluana y Chilca con actividad L-asparaginasa.

Figura N° 14. Genes ribosómicos 16S amplificados por PCR de las bacterias con actividad L-asparaginasa en gel de agarosa al 1%. Líneas (1 al 5 y 7 al 11) aislados, línea (6) Marcador DNA ladder 1 kb.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Concentraciones de iones en ambientes hipersalinos.

Tabla N° 2. Composición iónica de las Salinas de Maras.

Tabla N° 3. Clasificación de halófilos en función de NaCl.

Tabla N° 4. Grado de hidrólisis de L-asparagina por las bacterias aisladas de ambientes salinos.

Tabla N° 5. Crecimiento de las bacterias de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca con actividad L-asparaginasa a diferentes temperaturas.

Tabla N° 6. Crecimiento de las bacterias de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca con actividad L-asparaginasa a diferentes pH.

Tabla N° 7. Crecimiento de las bacterias de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca con actividad L-asparaginasa a diferentes concentraciones de sales.

Tabla N° 8. Perfiles de asimilación de azúcares de bacterias con actividad L-asparaginasa de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Tabla N° 9. Capacidad hidrolítica de diferentes sustratos de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Tabla N° 10. Cuadro resumen de los ensayos bioquímicos y microbiológicos de los aislados bacterianos productores de L-asparaginasa de las Salinas de Maras, Pilluana y Chilca.

Tabla N° 11. Perfiles de sensibilidad presuntiva antimicrobiana de los aislados bacterianos productores de la L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Tabla N° 12. Identificación molecular de los aislados de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1. Composición de stock agua de sales (SW) al 30 %.

Anexo N° 2. Composición del medio M-9 modificado con rojo de fenol propuesto por Gulati.

Anexo N° 3. Tabla del grado de hidrólisis de L-asparagina de las bacterias aisladas de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Anexo N° 4. Turbidez desarrollada por los aislados de las Salinas de Pilluana y Maras. Crecimiento:(+) Bajo, (++) Regular y (+++) Alto. Sin crecimiento (-).

Esta tesis fue financiada parcialmente por el fondo de promoción de tesis VRIP-2017 y el convenio N° 169 – Fondecyt – 2017.

RESUMEN

La L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) hidroliza la L-asparagina generando ácido L-aspártico y amoníaco. La principal utilidad de esta enzima es como agente terapéutico contra la leucemia linfocítica aguda (LLA); sin embargo, las L-asparaginasa comerciales presentan muchos problemas inmunológicos poniendo en riesgo la seguridad y eficacia de su actividad antineoplásica en el paciente. Las investigaciones continuas, están enfocadas en encontrar fuentes alternativas que presenten mejores características terapéuticas antineoplásicas con ninguna o baja inmunogenicidad. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue la caracterización fenotípica y genotípica de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca. Para la selección de los aislados productores de esta enzima se empleó el medio M-9 modificado. De los 106 aislados bacterianos, se seleccionaron 24 con actividad L-asparaginasa, de los cuales 12 presentaron mayor actividad. Después, se caracterizó fenotípicamente a los 24 aislados con actividad L-asparaginasa, de los cuales, el 29 % (7/24) creció en un amplio rango de sales entre 0,9 a 20 %. El 42 % fue bacilos Gram negativos, 50 % bacilos Gram positivos y 8 % cocos Gram positivos. Los aislados productores de L-asparaginasa hidrolizaron en mayor proporción Skim milk, almidón y CMC. Los azúcares más empleados fueron glucosa y fructosa. Para la caracterización molecular, se amplificaron los genes ribosómicos 16S de 15 aislados con actividad L-asparaginasa y se secuenciaron parcialmente. El análisis bioinformático se realizó mediante el programa BLASTn, los géneros identificados fueron *Bacillus* (11), *Enterobacter* (3) y *Halomonas* (1).

Palabras clave: bacterias halotolerantes, L-asparaginasa, ambientes salinos, DNAr 16S, *Bacillus*.

ABSTRACT

L-asparaginase (EC 3.5.1.1) hydrolyses L-asparagine to generate L-aspartic acid and ammonia. The main utility of this enzyme is as a therapeutic agent against acute lymphocytic leukemia (ALL); however, commercial L-asparaginases present many immunological problems in the risk of the safety and efficacy of their antineoplastic activity in the patient. Continuous research is focused on finding alternative sources that have better antineoplastic therapeutic characteristics with no or low immunogenicity. In this context, the objective of the present study was the phenotypic and genotypic characterization of bacteria with L-asparaginase activity from Salinas de Pilluana, Maras and Chilca. For the selection of the products derived from this enzyme, the modified M-9 medium was used. Of the 106 bacterial isolates, 24 were selected with L-asparaginase activity, of which 12 are more active. Afterwards, the 24 products with activity of L asparaginase were phenotypically characterized, of which, 29% (7/24) grew in a wide range of sales of 0.9 to 20%. 42% were Gram-negative bacilli, 50% Gram-positive bacilli and 8% Gram-positive cocci. The products derived from L-asparaginase hydrolyzed in a higher proportion skim milk, starch and CMC. The sugars most used were glucose and fructose. For molecular characterization, 16S ribosomal genes of 15 with L-asparaginase activity were amplified and partially sequenced. The bioinformatic analysis was carried out through the BLAST program, the proper genera were *Bacillus* (11), *Enterobacter* (3) and *Halomonas* (1).

Key words: Halotolerant bacteria, L-asparaginase, saline environments, 16S DNAr, *Bacillus*.

1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipersalinos son aquellos que contienen concentraciones de sal mayores a 3,5 %, donde habitan microorganismos halófilos y halotolerantes; están en todos los continentes destacando el Gran Lago Salado (USA), Mar Muerto (Israel), Salar de Bonneville (USA), Salar de Etosha (Namibia), Salar de Uyuni (Bolivia), entre otros. A nivel mundial, diversos estudios se realizan de forma progresiva sobre el potencial biotecnológico que presentan los microorganismos aislados de estos ambientes, destacando entre ellos las bacterias y las arqueas (1).

Las propiedades peculiares de las bacterias halófilas y halotolerantes, sobre todo sus requerimientos simples de fuente de carbono, llevaron a explorar la presencia de enzimas que soportan condiciones extremas de pH y/o temperatura (2). Además, estos microorganismos suelen producir diversas enzimas tales como: amilasas, celulasas, xilanasas, lipasas y proteasas, entre otras que son de interés industrial. Asimismo, producen poli- β -hidroxialcanoatos utilizados en la fabricación de plásticos biodegradables, solutos compatibles usados en cosmética, entre otros (3).

Las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca son ambientes que están ubicadas en las regiones selva, sierra y costa respectivamente, a diferentes condiciones climáticas albergando microorganismos productores de metabolitos y enzimas con potencial industrial. Así, el 2004, Maturrano y col. reportaron diversidad microbiológica en las Salinas de Maras, encontrando el predominio de *Pseudomonas halophila* (4). El 2010, Chavez-Hidalgo describió el predominio de los géneros *Halomonas*, *Bacillus*, *Marinobacter* e *Idiomarina* en las Salinas de Pilluana (5).

Por otro lado, la alta afinidad, especificidad y eficiencia catalizadora de las enzimas como L-asparaginasa convertida como un blanco terapéutico en la industria farmacéutica (6); esta enzima se utiliza en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, enfermedad con alto índice en pacientes pediátricos. Actualmente la L-asparaginasa comercial proviene de *Escherichia coli* y *Erwinia carotovora* (7). Sin embargo, el uso terapéutico de estas enzimas es limitado debido a las respuestas inmunológicas que causan en los pacientes después de su administración a largo plazo; por lo que es necesario, la búsqueda de nuevas enzimas que disminuyan los efectos adversos.

Las bacterias halófilas y halotolerantes han demostrado gran potencial en la producción de enzimas con propiedades novedosas para las industrias del

detergente, peletera, alimentaria, farmacéutica, entre otras. Además, debido a las propiedades peculiares de las enzimas de bacterias de ambientes hipersalinos, podríamos encontrar L-asparaginasa con promisorio uso terapéutico. Por ello, el presente trabajo de investigación busca promover el reconocimiento de la diversidad de bacterias productoras de L-asparaginasa de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca con potencial interés terapéutico, a través de su caracterización molecular.

1.1 Objetivo General

Caracterizar molecularmente las bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

1.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar bacterias con actividad L-asparaginasa a partir de aislados bacterianos de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca.
- Caracterizar las bacterias con actividad L- asparaginasa mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas.
- Caracterizar las bacterias con actividad L-asparaginasa mediante técnicas de amplificación y secuenciación de sus genes ribosómicos 16S.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Ambientes hipersalinos

En 1969, Thomas Brock refirió que los ambientes hipersalinos se encuentran dentro del grupo de los hábitats extremos, y que presentan condiciones fisicoquímicas extremas e inusuales (8).

Los ambientes hipersalinos están tanto en los hábitats acuáticos como terrestres y, presentan elevada concentración de sales, así como condiciones extremas de temperatura, pH, presión de oxígeno y baja disponibilidad de nutrientes, entre otras. Un ambiente hipersalino de origen terrestre es aquel que contiene una concentración de sales solubles superiores al 0,2 % y, se extienden especialmente en zonas áridas o semiáridas. Los acuáticos hipersalinos se caracterizan por contener altas concentraciones de sales inorgánicas superiores al agua de mar, es decir, más de 3,5 % de sales disueltas como se muestra en la tabla N° 1 (9).

La mayoría de los ambientes hipersalinos son de origen acuático clasificándose en dos tipos las talasosalinos y atalasosalinos, del termino griego “*thalasso*” mar. Las aguas talasosalinas tienen una composición salina parecida a la del agua de mar, por lo que predominan las concentraciones de Na^+ , Cl^- y $(\text{SO}_4)^{-2}$, su pH es ligeramente básico o neutro. Ejemplos típicos son las salinas solares artificiales y manantiales de origen marino como las Salinas Guerrero Negro (Baja California), Salinas de Maras (Perú), Salinas de Chilca (Perú). Las aguas atalasosalinas son aquellas cuya composición salina no se asemeja a la del agua de mar y están formadas por disoluciones de depósitos minerales de origen continental por lo que la composición es variable según la zona geográfica. Sin embargo, se ha descrito que en muchas de ellas predominan sales de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ y su pH es muy básico mayor o igual a 10. Ejemplos típicos son los salares y lagos salados, como el lago Mar Muerto (Israel, Jordania y Palestina), los lagos alcalinos del Gran Valle del Rift africano (Kenia), entre otros, donde su composición iónica varía en función a las condiciones topográficas, geológicas y climatológicas a las que esté sometida (10).

Muchos microorganismos no extremófilos (convencionales) no pueden sobrevivir en un ambiente hipersalino debido a la baja actividad del agua (a_w), es decir, que el exceso de sales interfiere en la disponibilidad del agua que los microorganismos

requieren para realizar sus diversos procesos metabólicos como disolver nutrientes, hidratar proteínas y ácidos nucleicos (11), entre otros. Sin embargo, algunos microorganismos logran adaptarse a estos medios generando estrategias de supervivencia.

Tabla N° 1. Concentraciones de iones en ambientes hipersalinos.

ión	Agua de Mar (g/L)	Gran Lago Salado (USA) (g/L)	Mar Muerto (Israel) (g/L)	Lago Bonney (Antártida) (g/L)
Na⁺	10,8	105,0	39,7	56,9
Mg²⁺	1,3	11,1	42,4	21,7
Ca²⁺	0,4	0,3	17,2	1,2
K⁺	0,4	6,7	7,6	2,3
Cl⁻	19,4	181,0	219,0	162,0
SO₄²⁻	2,7	27,0	0,4	2,9
TDS %	3,5	33,3	32,7	24,8

Fuente: Javor, 2012 (10)

2.2 Ambientes hipersalinos en el Perú

Los ambientes hipersalinos del Perú están ubicados principalmente en las llanuras desérticas de la costa del Pacífico, forma pequeños lagos, y estanques donde se concentra las sales tras la evaporación progresiva del agua. En Perú existen muchas zonas hipersalinas como las Salinas de Huacho y Chilca (Lima), Otuma (Ica), Maras (Cuzco), Pilluana (San Martín), Morrope (Lambayeque), etc (12).

2.2.1 Salinas de Chilca

Se ubica en la provincia de Cañete, departamento de Lima entre las coordenadas 12°31'07"S - 76°44'17"O a 3 m de altitud. Las Salinas de Chilca están conformadas por tres lagunas con alto contenido de sales denominadas "Milagrosa", "Mellicera" y "Encantada", sus capas freáticas están mineralizadas en cloruro de sodio, sulfatos, carbonatos, magnesio, potasio, boro, calcio, hierro, cobre, nitratos y otros elementos químicos que las hacen particularmente especiales (13).

2.2.2 Salinas de Pilluana

Se ubica en la provincia de Picota, departamento de San Martín, entre las coordenadas 6°46'33"S y 76°17'39"O a 200 m de altitud. Las minas de sal se encuentran en terrenos accidentados. Las salinas de Pilluana se caracterizan por poseer una concentración media de NaCl 20%, su principal afluente son las aguas termales del Picuro Huasi (14).

2.2.3 Salinas de Maras

Las salinas de Maras se ubican en la provincia de Urubamba, departamento de Cusco, entre las coordenadas 13°20'10"S y 72°09'24"O a 3380 m de altitud, cuya área superficial abarca los 131,85 km². Las salinas de Maras, conocida en la región como "minas de sal", están bajo la forma de terrazas en toda la ladera de la montaña Qaqawiñay. Estas salinas están conformadas por más de 3 000 pozas pequeñas con

un área promedio de 5 m² por poza según lo descrito por el Instituto Geológico del Perú, 1989 (15).

Su composición iónica está conformada por numerosos minerales como se observa en la tabla N° 2.

Tabla N° 2. Composición iónica de las Salinas de Maras.

Iones	Concentración de sales (g/L)
Na⁺	78,450
Mg²⁺	2,660
Ca²⁺	5,780
K⁺	1,350
Mn²⁺	0,002
Cl⁻	153,200
SO₄²⁻	4,180
Concentración de sal	24,600 %

Fuente: Maturrano, 2004 (4).

2.3 Bacterias de ambientes hipersalinos

Las bacterias halófilas, son microorganismos que crecen en concentraciones elevadas de sal. Kushner y Kamekura clasificaron a los halófilos considerando la concentración óptima de NaCl para su crecimiento como se observa en la tabla N° 3 (16).

Las bacterias halotolerantes son capaces de crecer en ausencia, así como en presencia de sal; y aquellas que son capaces de crecer por encima de aproximadamente 15 % (p/v) de NaCl (2,5 M) se consideran halotolerantes extremas (17).

Tabla N° 3. Clasificación de halófilos en función de NaCl (17)

Halófilo	Concentración	
	M	%
Ligeros o débiles	0,2 - 0,5	1 - 3
Moderados	0,5 - 2,4	3 - 15
Extremos	2,5 - 5,2	15 - 32

2.3.1 Mecanismos de adaptación

La capacidad que tienen los microorganismos halófilos para soportar factores de estrés extremo no solo es de interés científico, sino también biotecnológico. La explicación de cómo las bacterias halófilas estabilizan las biomoléculas frente a condiciones de estrés salino permite manipularlas adecuadamente y obtener provecho de esta particularidad. Los principales mecanismos de adaptación osmótica son: acumulación intracelular de KCl denominado *Salt-in* y por acumulación intracelular de solutos compatibles denominado *Salt-out* (2,18).

2.3.1.1 *Salt-in*

El mecanismo *Salt-in*, se basa en igualar o asemejar en lo posible la concentración salina intracelular con extracelular, mediante la acumulación de iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- . Este balance osmótico se da a través de bombas de iones y sistemas de transporte (Figura N° 1). El incremento de KCl en el citoplasma está relacionado a la osmoadaptación de todas las proteínas y otros componentes celulares a las altas concentraciones salinas, esta estrategia presenta un menor costo energético. Sin embargo, una alta concentración de sal intracelular requiere una mayor adaptación para mantener las funciones celulares. Por tal motivo, esta condición le permite baja flexibilidad frente cambios de salinidad extracelular. Se ha reportado algunas especies bacterianas que emplean esta estrategia como las anaeróbicas fermentativas y homoacetogénicas del orden *Halanaerobiales*, familia *Halobacteriaceae* y *Salinibacter ruber* (19).

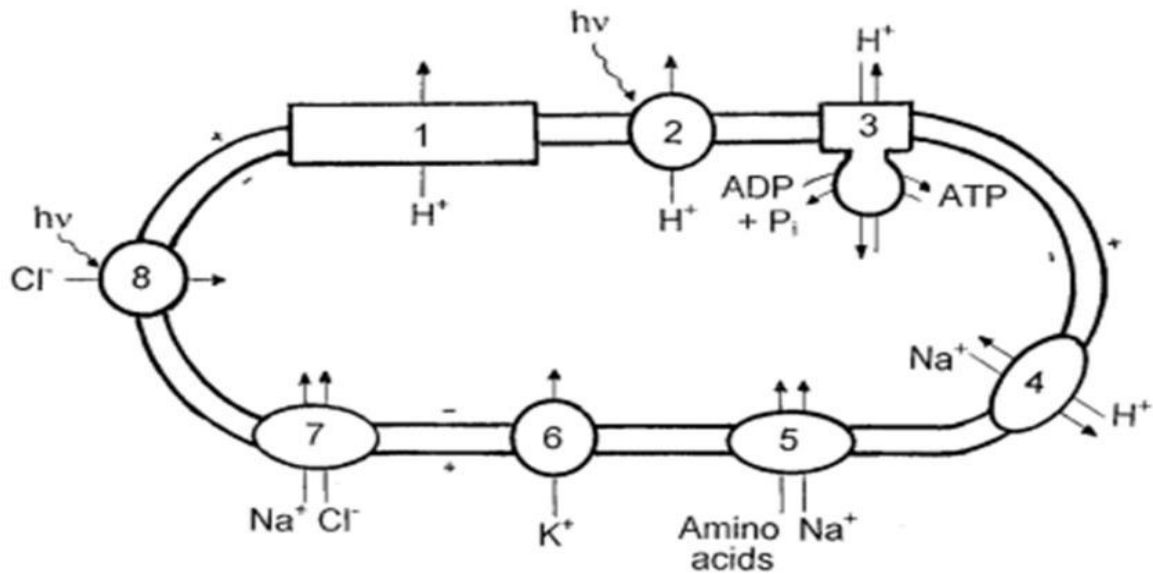
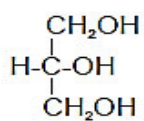


Figura N° 1. Mecanismo *Salt-in* en microorganismos bacterianos halófilos. Fuente: Oren 1998 (2).

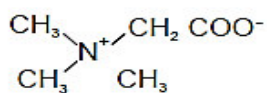
- 1, Eliminación de protones por la cadena respiratoria de transporte de electrones;
- 2, Expulsión de protones mediada por la bacteriorodospina;
- 3, Formación de ATP por la ATP sintasa;
- 4, Bomba antiporter Na^+/H^+ ;
- 5, Gradiente asociado al transporte de aminoácidos;
- 6, Transporte de potasio generado por el potencial de membrana;
- 7, Transporte de cloruro independiente de la luz, probablemente asociado al transporte de sodio;
- 8, Halorodospina, una bomba que incorpora Cl^- a la célula gracias a la luz.

2.3.1.2 ***Salt-out***

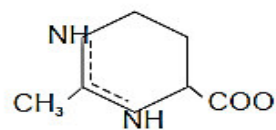
El mecanismo *Salt-out*, se basa en la biosíntesis y/o acumulación de solutos osmóticos orgánicos como se observa en la figura N° 2, con la acción conjunta de la expulsión de sales del citoplasma. Estos solutos son moléculas polares pequeñas, altamente solubles, con o sin carga neta neutra a pH fisiológico y con capacidad estabilizadora de proteínas y otros componentes frente a la desecación o la congelación, pueden alcanzar altas concentraciones intracelulares sin afectar las funciones celulares (replicación de DNA, interacciones DNA-proteínas) ni la maquinaria metabólica celular. Este modelo refiere que los solutos aumentan la tensión superficial del agua generando interacciones entre agua-agua y agua-proteína logrando formar una capa de hidratación alrededor de las proteínas favoreciendo los efectos estabilizadores. Es un sistema más flexible, debido a que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio, lo cual permite que los organismos que emplean esta estrategia estén presentes en diferentes tipos de ambientes salinos. Por otro lado, debido a que esta estrategia consiste en la expulsión de sales al medio extracelular, las enzimas no requieren el proceso de adaptación como ocurre en el mecanismo de *Salt-in*. Sin embargo, la acumulación de estos solutos orgánicos mantiene a la maquinaria enzimática estable a cambio de un costo energético alto. La estrategia *Salt-out* está presente en organismos halófilos y halotolerantes del dominio Bacteria y Eucarya (20).



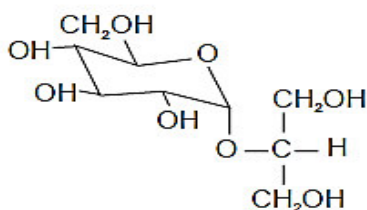
Glicerol



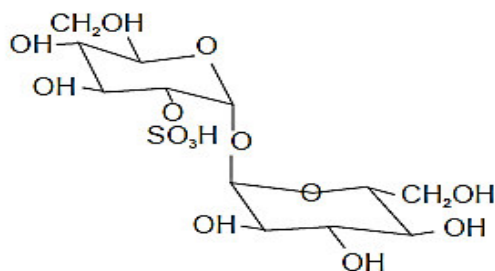
Glicina betaina



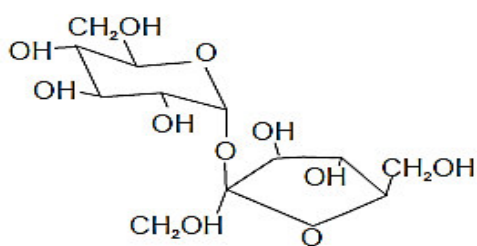
Ectoína



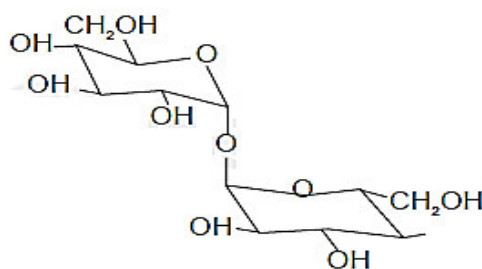
Glicosilglicerol



2-Sulfotrehalosa



Sacarosa



Trehalosa

Figura N° 2. Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y halotolerantes. Fuente: Gonzáles, 2002 (20).

2.4 L-asparaginasa bacteriana

2.4.1 Características generales

L-asparaginasa aminohidrolasa (EC 3.5.1.1) es una enzima que cataliza la hidrólisis de L-asparagina en ácido L-aspártico y amonio, químicamente está constituida por una proteína compuesta de 326 aminoácidos, con fórmula $C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17}$. Esta enzima está presente en microorganismos, vegetales y algunos animales. Esta enzima fue obtenida por manipulación genética de una cepa de *Escherichia coli* en el laboratorio Kyowa Hakko Kogyo Tokio (Japón); posteriormente se extrajo de *Erwinia chrysanthemi* (21).

2.4.2 Capacidad hidrolítica

El proceso de hidrólisis se produce en dos etapas, (figura N° 3). La primera, el residuo nucleofílico de la enzima se activa mediante una base fuerte y ataca el átomo de carbono de la amida de la L-asparagina (sustrato), generando un producto intermedio la betaacil-enzima. La segunda etapa es un ataque sobre el carbono éster producido por un nucleófilo activado por una molécula de agua, teniendo como productos aspartato y amonio. (22).

La L-asparaginasa también tiene la capacidad de catalizar otras reacciones. Por ejemplo, la L-asparaginasa producida por *Serratia marcescens* puede hidrolizar un 5% de L-glutamina, lo mismo ocurre con las L-asparaginases de *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi*. A la vez, la L-glutamina es un inhibidor competitivo de la hidrólisis de L-asparagina. La hidrólisis de la L-glutamina y L-asparagina son similares debido a la similitud estructural de ambos aminoácidos. Por lo tanto, la mayoría de L-asparaginases microbianas descritas presentan actividad cruzada con L-glutaminasa, con excepción de la de *Wolinella succinogenes* (23).

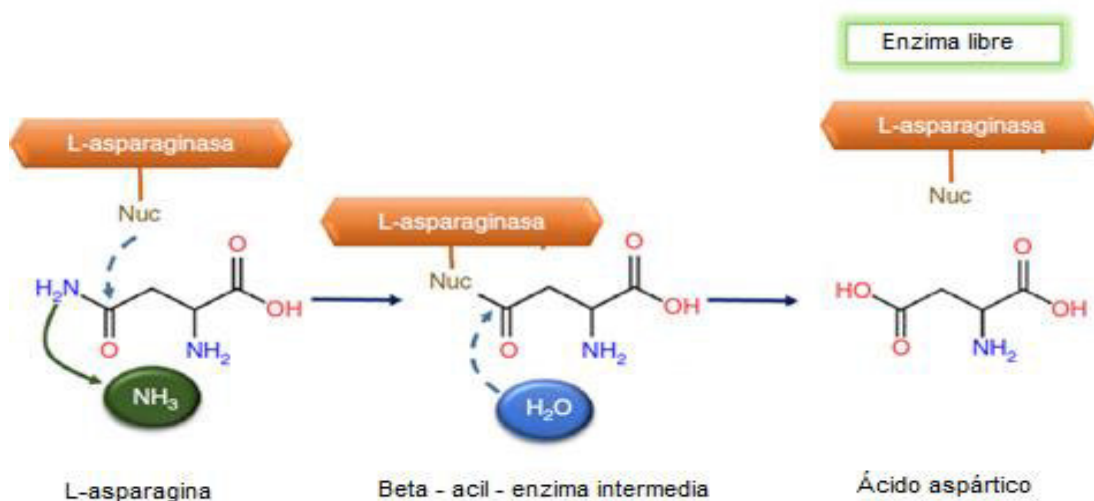


Figura N° 3. Mecanismo de la reacción catalítica de la L-asparaginasa. Las flechas discontinuas muestran ataque nucleófilo.
Fuente: Bessoumy, 2004. (22)

2.4.3 Tipos comerciales de L-asparaginasa

En los Estados Unidos, están disponibles tres formulaciones de L-asparaginasa: L-asparaginasa de *E. coli* nativa KIDROLASE[®], su forma pegilada ONCASPAR[®] (mono metoxi polietilenglicol-L-asparaginasa, PEG-asparaginasa) y *Erwinia* L-asparaginasa de *E. chrysanthemi*) ERWINASE[®].

L-asparaginasa de *E. coli*. Ha mejorado la supervivencia de los pacientes con LLA en los últimos años. En un estudio comparativo de dos formulaciones Crasnitin[®] (Bayer AG, Alemania) y Medac[®] (BFM), el cual utilizó un régimen de tratamiento similar, se observó que Medac[®] generaba reacciones adversas, especialmente coagulopatías como eventos hemorrágicos y trombóticos. También se describieron diferencias terapéuticas significativas a pesar de que ambas enzimas proceden de la misma especie. Medac[®] mostró una actividad biológica significativamente más alta, por lo que fue posible disminuir la dosis hasta 25-50% en contraste a la dosis del Crasnitin[®] (24).

L-asparaginasa de *Erwinia sp.* La L-asparaginasa de *Erwinia sp.* ha sido empleada para tratar pacientes con alergia a las L-asparaginases de *E. coli*. Las formulaciones que contienen L-asparaginases de *Erwinia* es mejor que las de *E. coli* en relación a la inmunogenicidad disminuyendo los trastornos de la coagulación. Sin embargo, la

eficacia antineoplásica es menor que la L- asparaginasas de *E.coli*. Así, un estudio se observó que la actividad de la L-Asparaginasa de *Erwinia* fue menor después de la primera exposición, solo se obtuvieron resultados en el 33% de pacientes en comparación con el 94,5% de los tratados con la de *E. coli*. Por otra parte, se observó una disminución del 26% y 92,6 % de L-asparagina después de una segunda exposición a pesar de las dosis equivalentes tanto de L-asparaginasa de *Erwinia* y *E.coli*, respectivamente. En algunos estudios similares con ERWINASE[®], la disminución completa de la L-asparagina se logró al tercer día del tratamiento pero fue efectivo en el 26 % de pacientes. Por lo tanto, la utilización de la L-asparaginasa de *Erwinia sp.* es una terapia válida de segunda o tercera línea (25).

PEG-asparaginasa. En la actualidad, una estrategia para reducir la inmunogenicidad, mejorar la vida media en el plasma y la antigenicidad de muchos agentes terapéuticos es su acoplamiento covalente con polietilenglicol (PEG), el proceso se conoce como PEGilación. PEG-asparaginasa es la modificación de L-asparaginasa formada por la conjugación covalente de L-asparaginasa de *E. coli* con monometoxipolietilenglicol que permitió variaciones farmacocinéticas significativas en comparación con las formulaciones nativas de *E. coli*, así como disminución de los efectos de inmugenicidad (26).

2.4.4 Aplicaciones biotecnológicas

2.4.4.1 Acción antineoplásica

La Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) o también conocida como Leucemia Linfoblástica Aguda es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento acelerado y descontrolado de linfocitos inmaduros llamados linfoblastos. Esta producción medular impide que se produzcan glóbulos blancos y rojos; y plaquetas normales. La LLA ocurre tanto en adultos como en niños, generalmente menores a 15 años de edad. El pico de incidencia ocurre a los 4 años, y representa aproximadamente del 75 al 80% de todas las leucemias infantiles. En los niños, la LLA representa el 25% de todas las enfermedades malignas (27).

Las células neoplásicas en la LLA se caracterizan por no poseer la enzima L-asparaginasa sintetasa, en consecuencia, para apoyar su crecimiento progresivo requieren una fuente externa de L-asparagina que deriva de alimentos y de la síntesis de novo en el hígado. La función de la L-asparaginasa terapéutica es hidrolizar la L-asparagina de la sangre privando este aminoácido a las células tumorales conllevando a la apoptosis “muerte celular” (figura N° 4). Esta enzima se administra por vía intravenosa o intramuscular, ya que por vía oral es destruída por las enzimas gástricas. La resistencia al medicamento se debe al aumento de la capacidad de las células tumorales para sintetizar L-asparagina. Las toxicidades incluyen un rango de reacciones de hipersensibilidad por ser una proteína extraña generando una disminución de los factores de coagulación, anomalías hepáticas, pancreatitis, convulsiones y coma debido a la toxicidad por amoníaco. Las enzimas son los catalizadores ideales para un sustrato específico, mucho más eficientes en sus características de reacción que cualquier catalizador desarrollado por el hombre. Sin embargo, cuando las enzimas se usan como fármacos tienen desventajas únicas como la pureza de las proteínas bacterianas y la distribución farmacocinética limitada en un sistema de mamíferos sobre todo a nivel plasmático. A menudo son inmunogénicas para el paciente, tienen una distribución biológica limitada y una eliminación rápida de la circulación (28).

Estas proteínas bacterianas se deben purificar ampliamente para eliminar las reacciones tóxicas y minimizar las reacciones inmunológicas. A pesar de estos

problemas, la L-asparaginasa de *E. coli* y *Erwinia* han contribuido en el tratamiento de los pacientes con LLA. Así mismo, se demostró que *E. coli* posee dos enzimas, una expresada constitutivamente (*EC1*, $K_m = 5 \text{ mM}$) y otra inducida por anaerobiosis (*EC2*, $K_m = 12.5 \text{ }\mu\text{M}$); solo el último fue inhibidor tumoral. Se han aislado enzimas inhibidoras de tumores a partir de otras bacterias como *Erwinia carotovora* y *Erwinia chrysanthemi*. A pesar del bajo K_m de *EC2*, tenía mayor estabilidad en la circulación del animal receptor así como acción antitumoral eficaz. Consecuentemente, se administran dosis múltiples de L-asparaginasa nativa dependientes del tiempo. La L-asparaginasa de *E. coli* (*EC2*) altamente purificada estuvo disponible para la industria farmacéutica y aunque se informaron excelentes respuestas, estas demostraron ser relativamente efímeras con una mediana de 122 días de supervivencia en los pacientes (29). Por ello, las investigaciones están centradas en hallar otras fuentes alternativas.

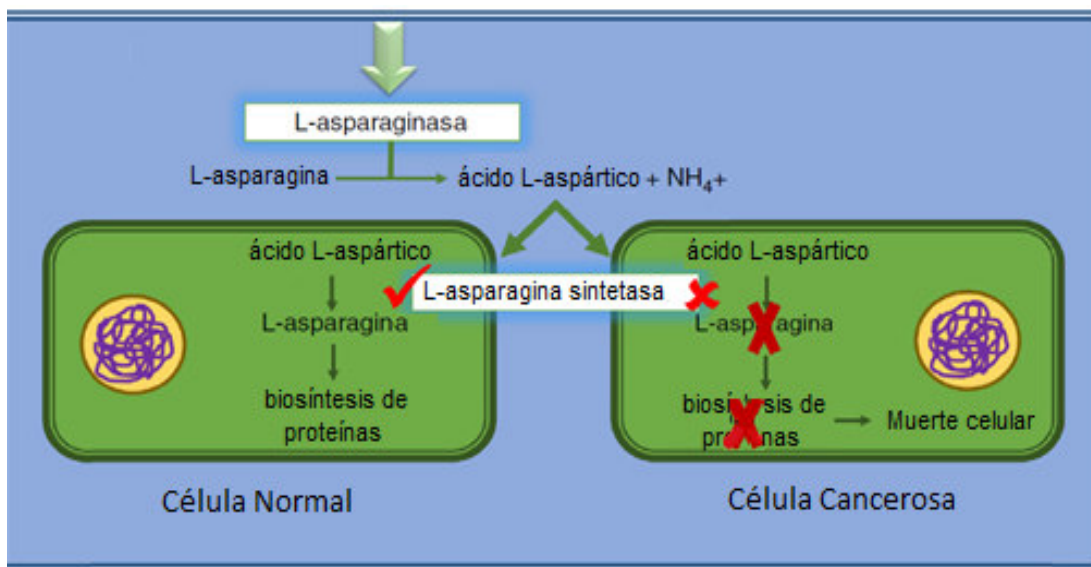


Figura N° 4. Muerte celular de la célula linfoblástica. Fuente: Van den Berg, 2011 (28).

Muchos factores influyen en la actividad antileucémica de la L-asparaginasa. Entre estos se encuentran los bioquímicos como la velocidad de hidrólisis, el K_m así como, el aclaramiento sérico del fármaco enzimático, el desarrollo de la resistencia celular a la L-asparaginasa, los efectos inmunológicos del huésped que conlleva a la formación de anticuerpos anti-L-asparaginasa y la formación de la L-asparagina a partir de la biosíntesis de novo en el hígado e ingesta de nutrientes. Los efectos tóxicos de la L-asparaginasa están relacionados principalmente con las reacciones inmunes a esta proteína bacteriana y los efectos de la reducción de la L-asparagina, y su posterior inhibición de la síntesis de proteínas en el hígado y páncreas. Las reacciones alérgicas son las toxicidades más prominentes, y aunque los grados 3 y 4 son menores a 1 y 2, se deben principalmente a Ab-antiasparaginasa en circulación. El principal evento es la hipersensibilidad, las proteínas bacterianas inducen reacciones inmunológicas que conducen a eritema transitorio, erupción localizada en el sitio de la inyección, urticaria, aferente respiratorio y anafilaxia aguda que amenaza la vida. Un estudio reportó que son alrededor del 60% de pacientes que sufren reacciones de hipersensibilidad durante el tratamiento con la L-asparaginasa de *E. coli*. Trastorno de la coagulación es otro evento que se presenta, es un conjunto de anomalías relacionadas a la deficiencia adquirida grave de proteínas afectando a las concentraciones del inhibidor de serina proteasa, antitrombina y antitripsina. Se observó que este problema se da tanto con la L-asparaginasa de *E. coli* como con la pegilada (30).

2.4.4.2 Disminución de acrilamida en alimentos procesados por calor

La acrilamida (C_3H_5NO) conocido como 2-propenamida, etileno carboxamida, acidamida propanoica o amida de ácido acrílico, cuya masa molecular es 71,08 g/mol (31). Varios estudios muestran que la L -asparagina es el principal aminoácido responsable de la producción de acrilamida en los alimentos fritos y horneados cuando los azúcares reductores se condensan con una fuente de carbonilo. Este fenómeno no ocurre en alimentos hervidos (32). La formación de acrilamida ha sido muy estudiada en los últimos años. Zyzak y col, 2003 detectaron que la cadena de amida presente en la estructura de acrilamida proviene de la L-asparagina. La

reducción o eliminación de reactivos (L-asparagina o azúcares reductores) es una de las estrategias para disminuir la concentración de acrilamida en los alimentos (33).

Para la reducción de la L-asparagina, se han investigado varias opciones, tales como: selección de especies vegetales con menor nivel de L-asparagina en su composición; deleción de enzimas importantes para el control de la biosíntesis de L-asparagina por supresión de genes específicos; hidrólisis ácida de L-asparagina que conduce a la formación de ácido aspártico y amoníaco; y el proceso de acetilación de L-asparagina para formar N-acetil-L-asparagina, evitando la formación de acrilamida a partir de N-glucósidos intermedios. Veinticuatro autores confirmaron que el uso de L-asparaginasa antes de freír u hornear el alimento podría reducir más del 99 % del nivel de acrilamida en el producto final procesado. Esto se debe a que la enzima reduce más del 88 % de la concentración de L-asparagina en el alimento inicial. Por ello, los últimos años, se han usado L-asparaginasa para disminuir los efectos negativos de los alimentos que contienen acrilamida sin perjudicar sus características organolépticas (31).

2.4.4.3 Obtención de aminoácidos

La L-asparaginasa también juega un papel importante en la biosíntesis de aminoácidos. De esta forma, el género *Corynebacteria* produce diversos aminoácidos de interés industrial y en grandes cantidades (34). Los aminoácidos derivados del ácido aspártico comercialmente importantes son lisina, treonina y metionina. El ácido aspártico en condiciones fisiológicas normales podría ser limitante para la biosíntesis de lisina y/o treonina. La L-asparaginasa convierte el exceso de L-asparagina en ácido aspártico, el precursor directo de la lisina y la treonina (35).

2.4.5 Fuentes de L-asparaginasa con novedosas propiedades inmunológicas

2.4.5.1 *Phaseolus vulgaris*

Actualmente, todas las preparaciones de L-asparaginasa, comerciales generan reacciones alérgicas significativas, y en menor grado con la L-asparaginasa PEGilada. Estas reacciones son comunes en la mayoría de pacientes y puede ser grave en aquellos que ya han recibido tratamiento; motivo para buscar nuevas fuentes que no solo garanticen el efecto antineoplásico sino también la eliminación o reducción de las reacciones adversas. Un estudio realizado de la L-asparaginasa de *Phaseolus vulgaris* (P-asp) mostró notables resultados en ambos factores tanto en la acción antineoplásica e inmunológica en comparación con las enzimas de *E. coli* y PEGilada. Se reportó que la P-asp presentaba un CI50 de 0,75 UI/mg siendo menor en comparación con la CI50 de 1,3 y 2 UI/mg de L-asp de *E.coli* y PEG-Asp. La CI50 es la concentración de enzimas, que se requiere para inducir el 50 % del efecto antiproliferativo. Por otro lado, al comparar estas tres preparaciones con una muestra control de células no tratadas, se observó que en la fase S del ciclo celular la P-asp. generó una disminución en comparación con la L-asp. de *E.coli* y PEG-asp. con diferencia significativa de $p < 0,001$, $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente. Así mismo, al analizar el efecto inmunológico, se observó que aquellos ratones tratados con P-asp. no detectaron cambios significativos en los niveles séricos de IgG y IgM, sin embargo, si se detectó un aumento significativo de IgG en aquellos tratados con L-asp. *E. coli*. Por otro lado, se conoce que los anticuerpos IgE son los que están asociados a la liberación de histamina de los mastocitos desencadenando las reacciones alérgicas, este estudio reportó que aquellos ratones que eran tratados con P-asp no produjeron un aumento en los niveles de IgE de igual manera con el grupo tratado con PEG-asp (36). Esto significa que la L-asparaginasa derivada de esta semilla presenta mejores características farmacocinéticas e inmunológicas; sin embargo, hace falta un análisis sobre costos/beneficio la metodología de extracción y purificación debería no ser muy compleja ni costosa, los medios de cultivo o extractos no deberían ser muy exquisitos, las condiciones de manipulación deberían ser sencillas y que los costos en general no deberían ser muy altos para que no se vea afectada al final la accesibilidad del medicamento.

2.4.5.2 *Aspergillus tamarii*

Un estudio realizado de la L-asparaginasa a partir del *Aspergillus tamarii*, reportaron que esta enzima presenta propiedades antitumoral y antiinflamatorio. Estudios *in vitro* indicaron que 50 µg/mL de L-asparaginasa mostraron inhibición de 52,38 % de desnaturalización de albúmina, 46,87 % a proteinasa, 55,26 % de hemólisis y 51,21 % de hemólisis hipotónica inducida. Se conoce que la L-asparaginasa bacteriana presenta muchos problemas de inmunogenicidad, reacciones alérgicas en algunos usuarios con el uso a largo plazo. Este estudio revela que la enzima derivada de *A. tamarii* puede disminuir las alergias y por lo tanto se debería realizar mayores estudios (37).

2.4.5.3 Bacterias de ambientes salinos

Las fuentes microbianas son importantes para la producción a gran escala de estas enzimas. Sin embargo, a largo plazo puede, la administración puede causar respuestas inmunológicas, por lo que se busca enzimas con nuevas propiedades farmacocinéticas y menor efecto inmunológico. Las bacterias halófilas y halotolerantes poseen características enzimáticas diferentes a las bacterias mesófilas, y se pueden considerar como una fuente potencial para la producción de enzimas que superen los efectos adversos. Estos microorganismos producen biocatalizadores únicos. Sin embargo, hay pocos estudios que evalúen su potencial en la producción de enzimas terapéuticas. La secreción de las enzimas a los medios de cultivo hace que el procesamiento sea fácil y barato al omitir el paso del contenido celular en el proceso de purificación. Un estudio realizado a partir de muestras del lago salado de Urmia, report a los género *Bacillus* y *Salicola*, los cuales bajo las condiciones óptimas obtenidas para la producción de L-asparaginasa (28 ° C, pH 6,0; NaCl al 3%, L-asparagina 5,8 g / L y glucosa 5 g / L), produjeron 61,7 U / mL (6).

Los ambientes marinos e hipersalinos son fuentes de microorganismos con características enzimáticas diferentes a las bacterias mesófilas (1). Los estudios basados en la búsqueda de bacterias productoras de L-asparaginasa, no solo queda ahí, sino también se aprovecha en la producción de otras enzimas de interes industrial.

En la India, Shaik y col, 2016 tomaron muestras de las costas de la bahía de Bengala, seleccionaron cinco aislados bacterianos productores de L-asparaginasa y amilasa. Además, dos produjeron lipasas, dos proteasas y uno celulasas. Estos fueron identificados molecularmente como *Streptomyces parvulus* (38). Biswas y col, 2013 estudiaron muestras de las salinas solares de las costas de Orissa, obtuvieron 12 aislados productores de L-asparaginasa de los cuales seis producían amilasas, ocho caseinasas, dos gelatinasas, ocho lipasas y uno ureasa. Diez aislados fueron identificadas como *Halomonas*, y dos como *Cobetia*. Estas enzimas se producían a nivel extracelular, esto facilitaba y aminoraba los costos durante la extracción y purificación enzimática (39). Pradhan y col, 2013 determinaron seis cepas productoras de L-asparaginasa, una presentó actividad de 23,8 IU/mL, éstas tenían la capacidad de hidrolizar gelatina, almidón y urea (40). Otro estudio en la misma provincia realizada por Mangamuri y col, 2017 identificó una cepa como *Streptomyces labedae* aislada de las costas de la bahía de Bengala, el cual demostró ser un excelente productor de L-asparaginasa, amilasa, proteasa, caseinasa, gelatinasa, catalasa y ureasa (41). Savani y col, 2017 recolectaron muestras de suelos de Surat en Gujarat, India, reportaron cuatro aislados bacterianos productores de L-asparaginasa, además presentaban capacidad de hidrolizar del almidón, caseína, oxidasa y catalasa positivos; sin actividad sobre urea y tributirina (42). Moorthy y col, 2010 reportaron una cepa de *Bacillus sp.* con capacidad hidrolítica sobre L-asparagina, almidón, gelatina, caseína y urea (43).

2.4.6 Bacterias halófilas y halotolerantes productoras de L-asparaginasa

Hongos, levaduras, actinomicetos y algas han demostrado ser fuentes promisorias de esta enzima. Aunque también se ha aislado de plantas y algunos animales (44).

Sin embargo, las bacterias son la mejor fuente de L-asparaginasa debido a que son fáciles de manipular a escala industrial resultando un proceso económico.

Khadiga y col, 2013 aislaron 60 bacterias extraídas de los suelos salinos de Qalubia y Sharkia, de los cuales solo dos mostraron ser potencialmente productores de L-asparaginasa. Los aislados fueron identificados como *Bacillus subtilis* y *marisflavi* (halófila moderada) con actividad L-asparaginasa de 23,11 y 20,01 U/mL respectivamente (45).

Bhat y col, 2015 analizaron muestras de los suelos salinos de Garden y Mangrovee (India) donde obtuvieron 885 aislados, de las cuales solo 15 resultaron positivos para la producción de L-asparaginasa. La cepa más productora fue identificada como *Salinicoccus sp.* (bacteria halófila extrema) con actividad de $15,94 \pm 0,46$ IU/mL (46).

Rudrapati y col, 2015 estudiaron muestras de sedimentos marinos de Nizampatnam, logrando seleccionar una bacteria con actividad L-asparaginasa de 145,32 UI / mL (47), la secuenciación del gen ADNr 16S mostró 99 % de similitud con *Pseudomona aureginosa*, bacteria halotolerante.

Trilokchandran y col, 2016 reportaron el aislamiento de 36 bacterias de los suelos de Bengaluru y Karnataka, logrando obtener 18 bacterias productoras de L-asparaginasa, donde seis de ellas mostraron actividades entre 50,9 UI/mL y 65,5 UI/mL (48).

Pejman y col, 2016 lograron seleccionar de 85 aislados, 13 bacterias Gram-positivas y tres Gram-negativas halotolerantes productores de L-asparaginasa. De las cuales, una de ellas destacó por su excelente actividad de 61,7 U/mL, identificada como *Bacillus aryabhattai* (6).

Alireza y col, 2011 tomaron muestras de diferentes partes del lago salado de Maharloo en el sur de Shiraz, Irán. Aislaron 11 bacterias halófilas moderadas con actividad L-asparaginasa, de las cuales nueve de ellas tenían actividad L-asparaginasa intracelular y extracelular y dos tenían sólo L-asparaginasa intracelular. Se encontró que *Bacillus sp.* producía 1,64 IU/mL (49).

Sindhwad y col, 2015 aislaron siete bacterias marinas de Tarapur (India) con actividad L-asparaginasa, mostrando una actividad de $75,73 \pm 0,82$ UI/mL fueron identificadas como *Bacillus pumilus*.(50)

Chande y col, 2014 aislaron del lago Lonar (India) cuatro bacterias halotolerantes productoras de L-asparaginasa con una actividad de 16,746 UI/mL, identificado como *Stenotrophomonas koreensis* (51)

2.5 Caracterización molecular bacteriana

Las técnicas moleculares son herramientas importantes en el análisis de microorganismos de diversas fuentes tales como alimentos y otros productos biológicos. Conforme la tecnología avanza las técnicas continúan evolucionando e incluso proporcionan formas de detectar una amplia gama de agentes en una sola prueba (52).

En la actualidad, las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos son primordiales por su especificidad (pueden detectar solo la molécula o microorganismo de interés), su sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo), su rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas) y pueden ser automatizadas (permiten tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos). El uso de técnicas moleculares ha permitido identificar nuevos microorganismos, lo cual no hubiese sido posible mediante técnicas tradicionales (53).

Así mismo, estas técnicas permiten la detección de microorganismos altamente patógenos, los cuales pueden ser identificados atenuados evitando así los riesgos de infección del analista. Las técnicas moleculares han demostrado ser útiles en situaciones clínicas donde los convencionales muestran poca sensibilidad, son lentos o complicados para su uso a gran escala. Algunas de las desventajas asociadas a las técnicas moleculares es que no distinguen entre microorganismos vivos y muertos, se requiere personal altamente capacitado para el desarrollo de las pruebas y equipos lo cual eleva la inversión inicial, además de la posibilidad de obtener falsos positivos y negativos. Sin embargo, el problema de falsos positivos y negativos se puede solucionar si se incluye en cada análisis controles positivo y negativo (54)

2.5.1 Técnicas para la caracterización molecular de bacterias

2.5.1.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Es un método que sirve para hacer muchas copias de una fracción específica de ADN a partir de una muestra que contiene pequeñas cantidades de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa hace posible la amplificación de esas fracciones de manera que se puedan detectar (Figura N° 5) (51,52).

Los pasos de un ciclo de PCR:

- I. Desnaturalización. La reacción se calienta lo suficiente generalmente a 96 °C para separar o desnaturalizar las cadenas de ADN. Esto genera los moldes de cadena sencilla.
- II. Hibridación. La reacción se realiza entre 55 °C y 65 °C para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.
- III. Extensión. La Taq polimerasa realice las hebras complementarias de ADN a 72 °C (55).

Este ciclo se repite de 25 a 35 veces, una reacción de PCR, normalmente puede durar de 2 a 4, de acuerdo a la longitud de la región de ADN que se copia.

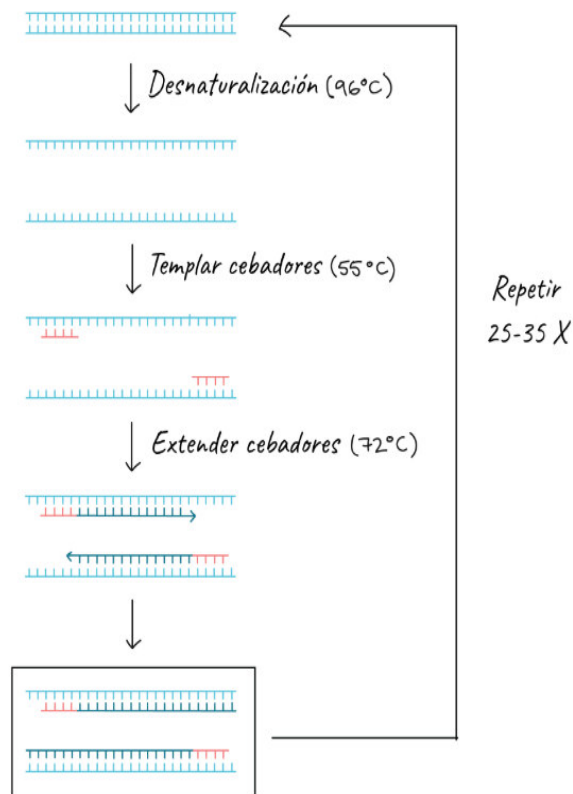


Figura N° 5. Pasos del ciclo de PCR (52)

2.5.1.2 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción llamadas endonucleasas y que varían entre individuos (53).

El RFLP se realiza mediante los siguientes pasos,

- I. Extracción del ADN. Se extrae el ADN de la sangre, saliva u otras muestras y luego se procede a purificar o el ADN se amplifica mediante PCR.
- II. Fragmentación del ADN. Se digiere el ADN usando endonucleasas de restricción. Las zonas de reconocimiento son generalmente de 4 a 6 pares de bases. Cuanto más corta es la serie reconocida, mayor es el número de fragmentos generados de la digestión.
- III. Electroforesis en gel. Los fragmentos de ADN se analizan usando electroforesis en gel, los cuales se separan según su tamaño. Las muestras que poseen los fragmentos de ADN se colocan en el compartimento que contiene el gel electroforético y dos electrodos. Cuando la muestra está

expuesta a un campo eléctrico, los fragmentos migran hacia el electrodo positivo los fragmentos pequeños se mueven rápidamente a través del gel.

- IV. Visualización de fragmentos. El gel se colorea con bromuro de etidio para que las bandas del ADN sean visibles (53)(56).

2.5.2 Secuenciación de los genes ribosómicos 16S

En 1969, Carl Woese y sus colegas decidieron examinar la secuencia del ARNr 16S de muchos microorganismos, con especial énfasis en bacterias inusuales que previamente no presentaron relación filogenética. Woese escogió el ARNr 16 S para la construcción de un árbol filogenético, debido a su universalidad y su alta conservación en estructura y función. Después propuso que los procariotas fueran divididos en dos dominios llamados arqueas y eubacterias. La comparación de las secuencias del ARNr 16S, ha facilitado grandemente, incluyendo microorganismos no cultivables, y la elucidación de sus relaciones naturales. Consecuentemente, estas pueden ser utilizadas para determinar relaciones taxonómicas entre especies que presentan poca interrelación en su DNA. Las secuencias nucleotídicas constantes del ARNr 16S presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los cebadores y así aplicar de forma más fácil la técnica de secuenciación (57)

2.5.3 Análisis bioinformático

Actualmente, el auge del secuenciamiento del ADN está produciendo una gran cantidad de datos de diferentes organismos. Estos datos permiten la comparación e identificación de organismos, utilizando herramientas de biología molecular. Las herramientas bioinformáticas permiten el análisis de esos datos como:

2.5.3.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Es un programa del NCBI de libre acceso que puede alinear secuencias a partir de una base de datos. Este programa tiene miles de entradas en menos de un minuto. BLAST realiza su alineación haciendo coincidir cada posición de su secuencia de búsqueda con cada posición de las secuencias en la base de datos. Para cada posición, BLAST da una puntuación positiva si los nucleótidos coinciden. BLAST también puede insertar huecos al realizar la alineación. Cada espacio insertado tiene

un efecto negativo en la puntuación de alineación, pero si se alinean suficientes nucleótidos como resultado de la separación, este efecto negativo se supera y la brecha se acepta en la alineación. Estos puntajes se usan luego para calcular la puntuación de alineación en "bits" que se convierte en el valor E estadístico. Una puntuación alta se correlaciona con un valor E bajo. Cuanto menor sea el valor de evaluación, más similar será la secuencia encontrada en la base de datos. Cuando se dan los resultados, la secuencia más similar es el primer resultado enumerado (58).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

3.1 Aislados bacterianos

Se analizaron 106 aislados bacterianos provenientes de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca, distribuidas en 30, 58 y 18 aislados respectivamente. Estas bacterias pertenecen al cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, las cuales fueron aisladas durante el año 2016. Para la reactivación de los aislados bacterianos se empleó un medio líquido constituido por agua de sales 5 % (Sea Water, SW) y extracto de levadura 0,5 %. Luego, los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 h.

Para los ensayos fenotípicos se preparó una solución stock de agua de sales (SW) 30 % de acuerdo al manual Halohandbook (59), la fórmula de sales se presenta en el anexo N° 1.

3.2 Selección de bacterias con actividad L-asparaginasa

Para la selección de bacterias con actividad asparaginolítica se utilizó el medio M-9 modificado suplementado con rojo de fenol, metodología analítica propuesta por Gulati (60), el cual se estandarizó empleando *E. coli* y *B.subtilis*, bacterias descritas como productoras de esta enzima. Para el ensayo con los aislados se realizó una modificación en la composición del medio debido a que el método de la referencia está dirigido para bacterias que no requieren elevadas concentraciones de sal para crecer, la composición del medio M-9 modificado se presenta en el anexo N° 2.

La preparación se realizó por la mezcla de las soluciones A, B y C como sigue:

1. “A”, contenía NaCl, Na₂HPO₄ 2H₂O, KH₂PO₄, CaCl₂ 2H₂O y MgSO₄ 7H₂O disueltas en agua destilada.
2. “B”, se disolvió L-asparagina en agua destilada hasta su completa disolución sobre agua caliente (Baño María).
3. “C”, se disolvió la glucosa y se resuspendió el agar en agua destilada.

Luego, se agregó rojo de fenol para obtener una concentración de 0,009 % .El pH se ajustó a $7 \pm 0,5$ con HCl 1N o NaOH 1N.

Después, se esterilizaron las soluciones “A”, “B” y “C” por autoclavado durante 15 min a 121 ° C. Finalmente, se mezclaron y se plaqueó a 50 °C. Después, las placas se guardaron en la estufa a 25 °C para eliminar el agua.

Los aislados bacterianos se cultivaron a 37 °C por 48 h. La actividad L-asparaginasa, se evidenció por la formación de zonas rosadas alrededor de las colonias.

Luego, para identificar los aislados bacterianos que presentaron mayor actividad enzimática, se hizo un análisis visual de las tonalidades básicas del rojo de fenol (figura N° 6), debido a que existe una relación directa entre la intensidad del color y la hidrólisis de la L-asparagina. En este ensayo, se utilizó un medio de cultivo líquido (caldo M-9 modificado), cuya fórmula fue antes mencionada sin añadir agar que permite una fácil visualización de las diferentes tonalidades en forma homogénea. La ausencia de agar no afecta la calidad del medio ya que solo actúa como un agente gelificante.

Este ensayo se realizó en tubo por triplicado y se inocularon una igual cantidad de cultivo celular bacteriano de 24 h. Para asegurar la concentración se midió la turbidez de la suspensión del inóculo por el método espectrofotométrico a 600 nm igualando la densidad óptica de 0,1 (60).

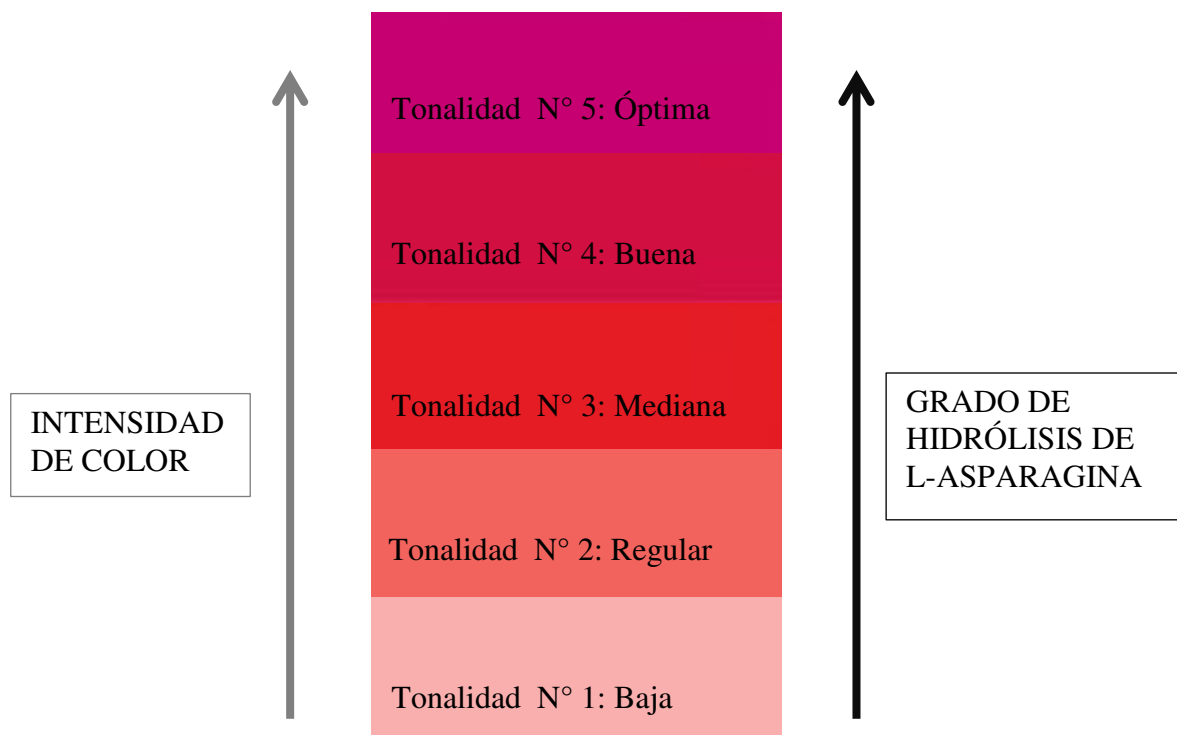


Figura N° 6. Escala de tonalidades del rojo de fenol en medio alcalino. Los números del 1 al 5 (escala arbitraria) representarán en adelante el grado de hidrólisis de la L-asparaginasa de los aislados.

3.3 Caracterización fenotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa

3.3.1 Identificación microscópica

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en medio Trypto-casein Soy Broth (TSB) al 3 % (p/v) en agua de sales 5 % (p/v) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego, se realizó la tinción Gram y se observó al microscopio a un aumento de 100 X utilizando aceite de inmersión.

Para iniciar la tinción primero se colocó una gota del cultivo sobre un portaobjeto estéril y se flameó ligeramente hasta que se evapore el líquido y esté seco. Luego se procedió con los siguientes pasos (61) :

- A la muestra se añadió solución cristal violeta, durante 1 min y se enjuagó.
- Luego se colocó lugol por 1 min y se enjuagó.
- Se enjuagó con alcohol cetona por 5 seg y se escurrió.

- d) A la muestra se añadió solución de safranina, durante 1 min y se enjuagó.
- e) Finalmente se dejó secar.

3.3.2 Pruebas fisiológicas

3.3.2.1 Tolerancia a temperatura, pH y concentración salina.

Para realizar estas pruebas, se hizo crecer a los aislados en agua de sales 5 % con extracto de levadura 0,5 % a las temperaturas de 4, 20, 30, 37 y 42 °C por 48 h.

Por otro lado, en la tolerancia salina se utilizaron las concentraciones de 0,9, 5, 10, 15 y 20 %. Se hizo crecer a los aislados con extracto de levadura 0,5 % a 37 °C por 48 h.

A la vez para analizar el rango de pH se emplearon los buffers acetato, fosfato y glicina. Se hizo crecer a los aislados en agua de sales 5 % a pH 5, 6, 7, 8 y 9 a 37 °C por 48 h. La formación de turbidez en el tubo indicó prueba positiva (62) .

3.3.3 Pruebas nutricionales

Se analizaron cinco azúcares de forma individual, los cuales fueron glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa y maltosa. Se cultivaron a los aislados con agua de sales 5 % suplementado con extracto de levadura 0,5 % y se agregó cada azúcar a una concentración de 0,2 % a 37 °C por 48 h. La formación de turbidez indicó prueba positiva (63).

3.3.4 Pruebas hidrolíticas

3.3.4.1 Actividad celulolítica

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en agar 2 % con SW 5% suplementado con extracto de levadura 0,2 % y carboximetilcelulosa 1 % (CMC). Se incubaron las bacterias a 37 °C por 48 h. Luego, las placas se revelaron con una

solución de rojo de congo 0,1 %. La hidrólisis de la carboximetilcelulosa se evidenció por la formación de halos claros alrededor de las colonias (64).

3.3.4.2 Actividad amilolítica

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en agar 2 % con SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,2 % y almidón 1 %. Las bacterias se incubaron a 37 °C por 48 h. Luego, las placas se revelaron con una solución de lugol. La hidrólisis del almidón se evidenció por la formación de halos claros alrededor de las colonias (65).

3.3.4.3 Actividad proteolítica

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en agar 2 % con SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,2 % y skim milk 1 %. Las bacterias se crecieron a 37 °C por 48 h. La hidrólisis de la caseína se evidenció por la formación de halos claros alrededor de las colonias (66).

3.3.4.4 Actividad lipolítica

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en agar 2 % con SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,2 %, tributirina 1 % y tritón X-100 0,1 %. La tributirina se esterilizó por separado y se añadió a los otros componentes. Las bacterias se incubaron a 37 °C por 48 h. La hidrólisis de la tributirina se evidenció por la formación de halos claros alrededor de las colonias (62).

3.3.4.5 Producción de DNAsa

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en agar ADN con SW 5 %. Las bacterias se incubaron a 37 °C por 48 h. Luego las placas se revelaron con HCl

0,1 N. La hidrólisis del ácido dexosirribonucleico se evidenció por la formación de halos claros alrededor de las colonias (65).

3.3.5 Pruebas bioquímicas

3.3.5.1 Prueba de catalasa

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,5 %. Se incubaron a 37 °C por 24 h. Se extrajo una pequeña muestra de cultivo bacteriano sobre una lámina portaobjeto estéril y se añadió gotas de peróxido de hidrógeno 3 % (p/v). La formación de burbujas indicó la producción de catalasa (67)

3.3.5.2 Producción H₂S y gas

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en agar TSI 6,5 % suplementado con SW 5 %. Las bacterias se incubaron a 37 °C por 24 h. El ennegrecimiento y formación de burbujas o ruptura del medio de cultivo indicó la producción de H₂S y gas, respectivamente (63).

3.3.5.3 Prueba de fermentación y oxidación de glucosa

Para esta prueba, los aislados bacterianos se cultivaron en medio basal O/F Hugh & Leifson suplementado con SW 5 % y glucosa 1 %. Se calentó con agitación frecuente hasta ebulir. Los tubos destinados para el ensayo de fermentación se añadieron vaselina líquida esterilizada y los tubos destinados para la oxidación no se añadieron vaselina, una vez sembrados se incubaron a 37 °C por 48 h.

La fermentación de glucosa se evidenció por el viraje a amarillo en tubo cerrado y la oxidación por el viraje a amarillo en tubo abierto (63).

3.3.6 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Para esta prueba, se empleó el método Kirby-Bauer, los aislados bacterianos se cultivaron en agar SW 5 % suplementado con extracto de levadura 0,5 %. Una vez sembrados los aislados se colocaron los antimicrobianos en discos y se incubó a 37 °C por 48 h. Los antimicrobianos utilizados fueron: ampicilina (10 µg/disco), gentamicina (10 µg/disco), levofloxacina (5 µg/disco), ácido nalidíxico (30 µg/disco) y cloranfenicol (30 µg/disco). La formación de halos alrededor de los discos indicó como sensible (+) (63,68)

3.4 Caracterización genotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa

3.4.1 Extracción de ADN genómico

Se realizó aplicando el método de solventes orgánicos según lo descrito por Chavez-Hidalgo, 2010 con las modificaciones siguientes (63):

3.4.1.1 Lisis

De un cultivo celular de 24 h de crecimiento se tomaron 2 mL y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min obteniéndose un precipitado celular, el cual se lavó dos veces con una solución de PBS 1X conteniendo NaCl al 3 % y nuevamente se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min. Al precipitado celular se añadieron 600 µL de TSE 1X, 60 µL de SDS al 10 % y 10 µL de proteinasa K, se incubó a 56 °C por 2 h.

3.4.1.2 Purificación

Para la purificación del ADN se añadieron 600 µL de mezcla fenol/cloroformo 1:1, se homogenizó y centrifugó a 10 000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se añadieron 600

μL de cloroformo, se homogenizó y centrifugó a 10 000 rpm por 5 min. Después se separó la fase acuosa que contiene ADN.

3.4.1.3 Precipitación

A la fase acuosa se adicionaron 100 μL de acetato de sodio 3 M y 600 μL de etanol absoluto, y se guardó a -20 °C por 2 h. Luego, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min, el precipitado se lavó con 500 μL de etanol al 70 % y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min, este paso se realizó dos veces. El ADN extraído se resuspendió con 50 μL de tampón TE.

Finalmente, se verificó la concentración y pureza del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

3.4.2 Amplificación de los genes ribosómicos 16S

Las condiciones de reacción por PCR fueron las siguientes (62, 63):

Volumen de reacción: Se emplearon 25 μL que contenía: KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, tritón X-100 0,1 % (v/v), MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 μM, cebadores 20 pmoles de c/u y Taq ADN-polimerasa 1,5 U/μL (Reactivos de invitrogen) y 50 ng de ADN

Cebadores Específicos: Se utilizaron cebadores universales específicos para el dominio *Eubacteria*.

16 SBF 5' –AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

16 SBR 5' –GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Condiciones de amplificación: Se utilizó un termociclador (Perkin Elmer 2400) donde se realizó una primera desnaturalización a 94 °C por 4 min y luego 35 ciclos con las siguientes etapas:

Desnaturalización: 94 °C por 45 s

Hibridación: 55 °C por 1 min

Extensión: 72 °C por 45 s

Finalmente una extensión de 72 °C por 7 min

3.4.3 Secuenciación de los genes ribosómicos 16S y análisis bioinformático

Previo al secuenciamiento, se llevó a cabo la amplificación de los genes ribosómicos 16S mediante PCR a partir del ADN extraído anteriormente. La secuenciación se llevó a cabo por servicios en la Universidad Peruano Cayetano Heredia.

Para el análisis de secuencias se utilizó el programa bioinformático BLASTn, el cual permitió determinar el grado de similitud entre las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S de las bacterias en estudio con las registradas en la base de datos de libre acceso del Banco de Genes (GeneBank) del NCBI (National Center for Biotechnology Information)

4. RESULTADOS

4.1 Selección de bacterias con actividad L-asparaginasa

En la estandarización del medio M-9 modificado se utilizó *E. coli* y *B. subtilis* a 37 °C por 24 h. La formación de zonas rosadas alrededor del sembrado indicó hidrólisis de L-asparagina. *E.coli* mostró mayor capacidad hidrolítica que *B.subtilis* (Figura N° 7).



Figura N° 7. Zonas de hidrólisis de L-asparagina en el medio M-9 modificado por *E. coli* y *B.subtilis*

Después de la estandarización del método, el medio M-9 modificado se empleó para el cultivo de los aislados bacterianos. De los 106 aislados, 24 (23%) presentaron actividad L-asparaginasa correspondiendo 11, 12 y uno a las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca, respectivamente. Estos aislados fueron: CH11, M54, M62, M75, M55, M72, M57, M68, M74, M67, M64, M84, M76, P4, P17, P19, P23, P31, P20, P7, P16, P13, P6 y P2.

En la figura N° 8 se muestra a los aislados M56, M77 y M86 que presentaron escasa actividad. Por otro lado, los aislados M68 y M67 demostraron mayor actividad y en menor grado M74 y M84.

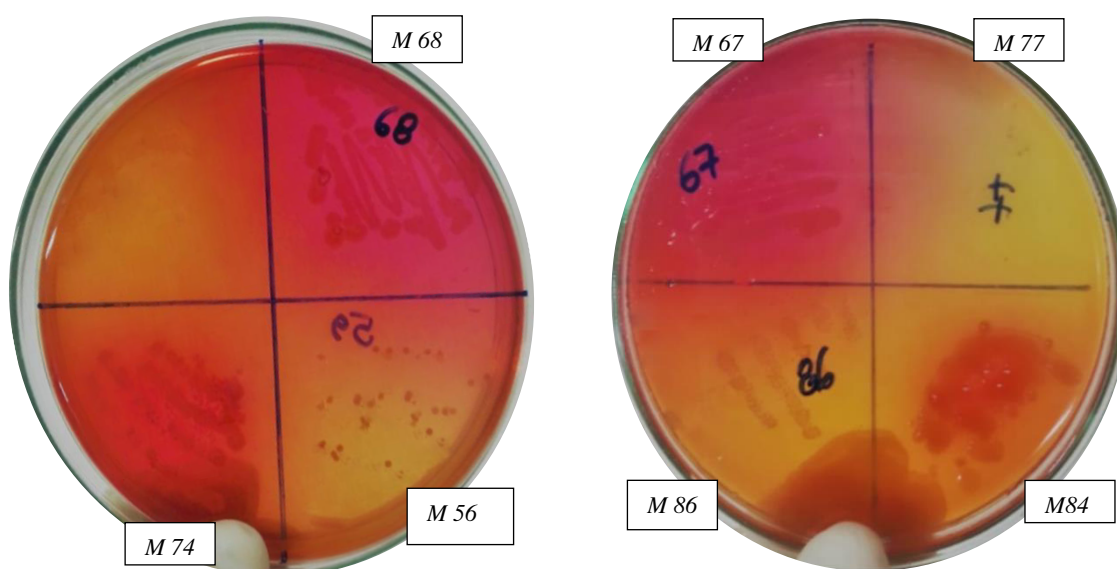


Figura N° 8. Medio M-9 modificado con zonas de hidrólisis de L-asparagina de los aislados M74, M68, M67 y M84.

En la utilización del caldo M-9 modificado, la mayor capacidad hidrolítica de L-asparagina se evidenció con las tonalidades N° 5 y N°4, coloración fucsia.

En la tabla N° 4, se presenta el número de aislados bacterianos ordenados por grado de hidrólisis de L-asparagina, las bacterias que presentaron mayor actividad L-asparaginasa fueron de las salinas de Maras en un 38 % y de Pilluana en 12 %, considerando los grupos de buena y óptima hidrólisis.

En la figura N° 9, se muestra en porcentajes el número de aislados bacterianos distribuidos por grado de hidrólisis de L-asparagina (baja, regular, mediana, buena y óptima), el 50 % de los aislados presentó mayor actividad L-asparaginasa entre buena y óptima hidrólisis.

El grado de hidrólisis de cada aislado se observa en el anexo N° 3.

Tabla N° 4. Grado de hidrólisis de L-asparagina por las bacterias aisladas de ambientes salinos.

Salinas	Aislados (N)	Cepas (%)	Grado de hidrólisis de L-asparagina				
			1	2	3	4	5
Maras	12	50	-	1 (4 %)	2 (8 %)	4 (17 %)	5 (21%)
Pilluana	11	46	3 (13 %)	-	5 (21%)	1 (4 %)	2 (8%)
Chilca	1	4	-	1 (4 %)	-	-	-
Total	24	100	3 (13 %)	2 (8 %)	7 (29 %)	5 (21 %)	7 (29 %)

Grado de hidrólisis: 1, baja; 2, regular; 3, mediana; 4, buena y 5, óptima.

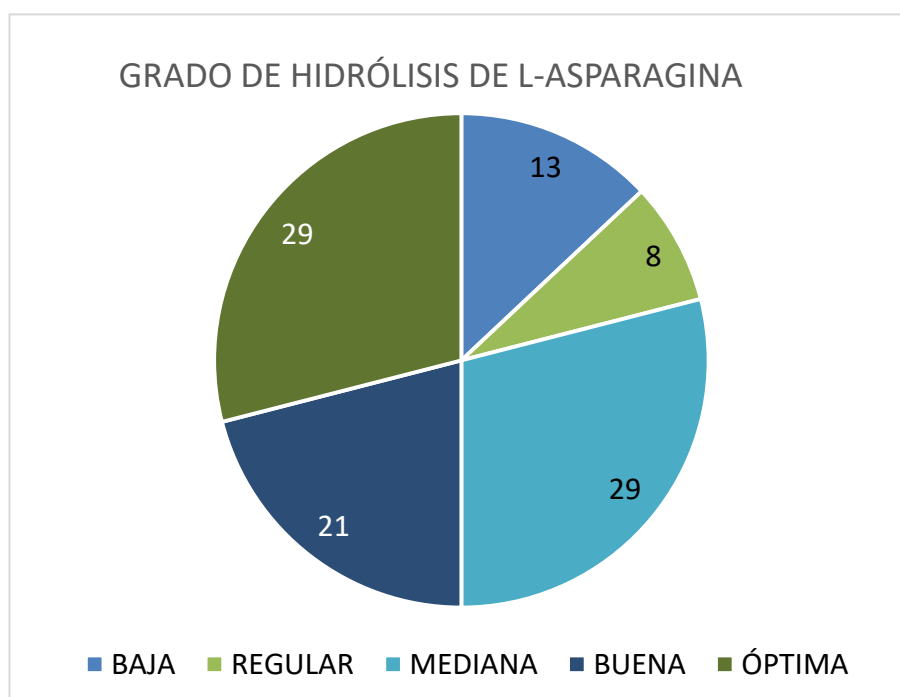


Figura N° 9. Porcentaje de aislados de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca distribuido por grado de hidrólisis de L-asparagina.

En la figura N° 10, se presenta los resultados del ensayo con caldo M-9 modificado. Los aislados M72, M64 y P7 presentaron óptima hidrólisis seguido de P19 con buena hidrólisis. Los demás aislados presentaron menor actividad.

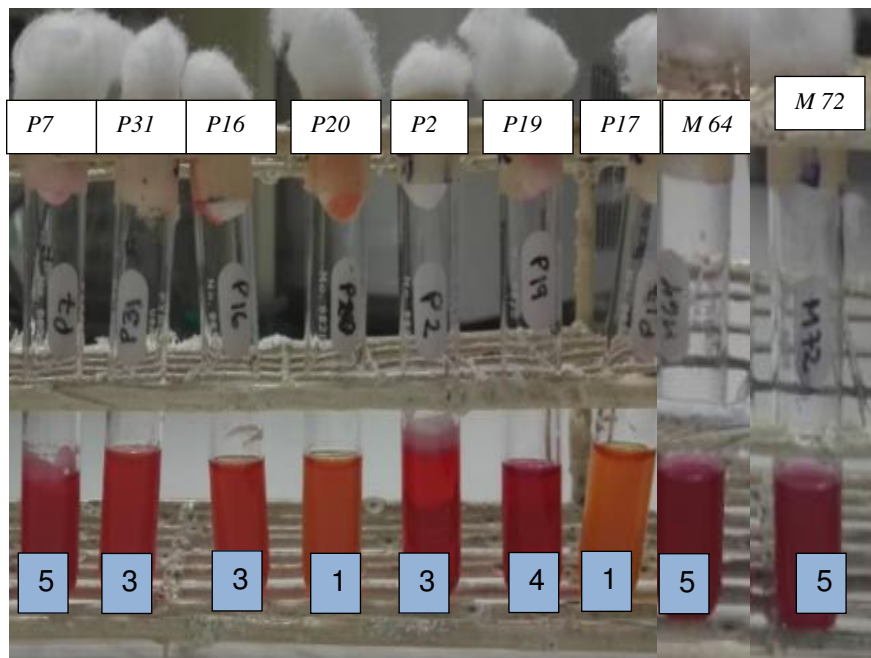


Figura N° 10. Tonalidades de coloración según grado de hidrólisis de L-asparagina de los aislados de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca

4.2 Caracterización fenotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa

4.2.1 Pruebas fisiológicas

En este ensayo se evaluó la turbidez generada por el crecimiento bacteriano. Los aislados se clasificaron de acuerdo al nivel de turbidez, bajo (+), regular (++), alto (+++) y (-) sin crecimiento. La medición de turbidez considerada para cada nivel fue (+). < 0,2; (++) > 0,5; (+++) > 1,0 (anexo N° 4).

Tolerancia a la temperatura

En la evaluación a 4 °C, se observó que el 75 % (18/24) de las bacterias creció regular y el 25 % (6/24) no creció. A 20°C, se observó que el 71 % presentó un alto crecimiento, 4 % (1/24) regular, 13 % (3/24) bajo y el 13 % (3/24) no creció. A 30 °C, se observó que el 96 % (23/24) presentó un alto crecimiento y 4 % (1/24) crecimiento regular. A 37 °C, se observó que el 100 % (24/24) presentó un alto crecimiento. Finalmente, a 42 °C, se observó que el 8 % (2/24) presentó un alto crecimiento, 8 % (2/24) regular, 13 % (3/24) bajo y 71 % (17/24) no creció (tabla N° 5).

Tabla N° 5. Crecimiento de las bacterias de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca con actividad L-asparaginasa a diferentes temperaturas.

Procedencia	Cepas	Temperatura (°C)				
		4	20	30	37	42
S. Chilca	CH11	-	-	+++	+++	++
S. Maras	M54	++	+++	+++	+++	+++
	M84	++	++	+++	+++	-
	M62	++	+++	+++	+++	-
	M75	++	+++	+++	+++	+
	M55	++	+++	+++	+++	++
	M74	++	+++	+++	+++	+
	M72	++	+++	+++	+++	-
	M67	++	+++	+++	+++	-
	M68	++	+++	+++	+++	-
	M57	++	+++	+++	+++	-
	M64	++	+++	+++	+++	-
	M76	++	+++	+++	+++	+
S. Pilluana	P4	++	+++	+++	+++	-
	P17	-	+++	+++	+++	-
	P19	-	+	+++	+++	+++
	P23	++	+++	+++	+++	-
	P31	-	+	+++	+++	-
	P20	++	+++	+++	+++	-
	P7	++	+++	+++	+++	-
	P16	++	+	+++	+++	-
	P13	++	+++	+++	+++	-
	P6	-	-	+++	+++	-
	P2	-	-	++	+++	-

Crecimiento:(+). bajo:(++). regular: (+++). alto v (-). sin crecimiento.

Tolerancia al pH

En la evaluación a pH 4, se observó que el 88 % (21/24) de las bacterias presentó alto crecimiento, 8 % (2/24) regular y el 4 % (1/24) bajo. A pH 6, se observó que el 88 % (21/24) presentó alto crecimiento, 8 % (2/24) regular, 4 % (1/24) bajo. A pH 7, se observó que el 96 % (23/24) presentó alto crecimiento y 4 % (1/24) crecimiento regular. A pH 8, se observó que el 88 % (21/24) presentó alto crecimiento y 12 % (3/24) regular. Finalmente, a pH 9, se observó que el 88 % (21/24) presentó alto crecimiento, 8 % (2/24) regular y 4 % (1/24) no creció (tabla N° 6).

Tabla N° 6. Crecimiento de las bacterias de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca con actividad L-asparaginasa a diferente pH.

Procedencia	Cepas	pH				
		4	6	7	8	9
S. Chilca	CH11	+++	+	+++	++	-
S. Maras	M54	+++	+++	+++	+++	+++
	M84	+++	+++	+++	+++	+++
	M62	+++	+++	+++	+++	+++
	M75	+++	+++	+++	+++	+++
	M55	+++	+++	+++	+++	+++
	M74	+++	+++	+++	+++	+++
	M72	+++	+++	+++	+++	+++
	M67	+++	+++	+++	+++	+++
	M68	+++	+++	+++	+++	+++
	M57	+++	+++	+++	+++	+++
	M64	+++	+++	+++	+++	+++
	M76	+++	+++	+++	+++	+++
S. Pilluana	P4	+++	+++	+++	+++	+++
	P17	+++	+++	+++	++	++
	P19	+++	+++	+++	+++	+++
	P23	+++	+++	+++	+++	+++
	P31	+++	++	+++	+++	+++
	P20	++	+++	+++	+++	+++
	P7	+++	+++	+++	+++	+++
	P16	+++	+++	+++	+++	+++
	P13	+++	+++	+++	+++	+++
	P6	++	+++	+++	+++	+++
	P2	+	++	++	++	++

Crecimiento:(+), bajo;(++), regular; (+++), alto y (-), sin crecimiento.

Tolerancia salina

En la evaluación al 0,9 % de sales, se observó que el 63 % (15/24) tuvo un alto crecimiento, 33 % (8/24) regular y el 4 % (1/24) no creció. Al 5 % de sales, se observó que el 96 % (23/24) presentó un alto crecimiento y el 4 % (1/24) regular. Al 10 % de sales, se observó que el 92 % (22/24) presentó alto crecimiento y 8 % (2/24) crecimiento regular. A 15 %, se observó que el 63 % (15/24) presentó alto crecimiento, 12 % (3/24) regular, 8 % (2/24) bajo y 12 % (3/24) no creció. Finalmente, al 20 % de sales, se observó que el 33 % (8/24) presentó crecimiento regular y 67 % (16/24) no creció (tabla N° 7).

Tabla N° 7. Crecimiento de las bacterias de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca con actividad L-asparaginasa a diferentes concentraciones de sales.

Procedencia	Cepas	Concentración salina (%)				
		0,9	5	10	15	20
S. Chilca	CH11	+++	+++	+++	++	++
S. Maras	M54	-	+++	+++	+++	++
	M84	++	+++	+++	+++	-
	M62	+++	+++	+++	+++	-
	M75	+++	+++	+++	+++	-
	M55	+++	+++	+++	+++	-
	M74	++	+++	+++	+++	++
	M72	+++	+++	+++	+++	-
	M67	+++	+++	+++	++	-
	M68	+++	+++	+++	+++	-
	M57	+++	+++	+++	+++	++
	M64	+++	+++	+++	+++	++
	M76	+++	+++	+++	+++	++
S. Pilluana	P4	+++	+++	+++	+++	++
	P17	+++	+++	+++	-	-
	P19	++	+++	++	+	-
	P23	++	+++	+++	-	-
	P31	++	+++	++	+	-
	P20	++	+++	+++	-	-
	P7	+++	+++	+++	+++	-
	P16	++	+++	+++	+++	-
	P13	++	+++	+++	+++	++
	P6	+++	+++	+++	++	-
	P2	+++	++	+++	-	-

Crecimiento:(+), bajo;(++), regular; (+++), alto y (-), sin crecimiento.

4.2.2 Pruebas nutricionales

En los 24 aislados bacterianos se observaron seis perfiles fenotípicos (A, B, C, D, E y F), los cuales se detallan en la tabla N° 8, esta presenta las características de cada perfil, el número de aislados y cepas correspondientes en cada uno. Asimismo, se destaca a los aislados bacterianos del perfil “A” debido a su capacidad de asimilar todos los azúcares del ensayo, ya que permite a las bacterias escoger diversas fuentes de carbono para su crecimiento y no limitarse exclusivamente a un tipo de azúcar. Por otro lado, cabe resaltar que los perfiles “C” y “F” presentan aislados que asimilan tres azúcares, con igual interés industrial. También se observa que la glucosa fue asimilada por los veinticuatro aislados seguido de la fructosa en un 100 y 92 %, respectivamente.

Tabla N° 8. Perfiles de asimilación de azúcares de bacterias con actividad L-asparaginasa de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca

Perfiles fenotípicos	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Fructosa	Cepas (N)	%	Cepas
A	+	+	+	+	6	25	M54, M75, P23, P16, P6 y P2
B	+	-	-	+	9	38	M62, M55, M67, M68, M57, M64, M76, P4 y P13
C	+	-	+	+	6	25	CH11, P17, P19, P31, P20 y P7
D	+	-	-	-	1	4	M84
E	+	-	+	-	1	4	M74
F	+	+	-	+	1	4	M72
Total					24	100	-

En la figura N° 11, se presenta en porcentaje el número de aislados por cada perfil, se observa que los perfiles A, B y C son los que presentan mayor número de aislados constituyendo un 88 % del total. Siendo el perfil “B” con mayor población bacteriana seguido de los perfiles “A” y “C” cuya proporción es similar.

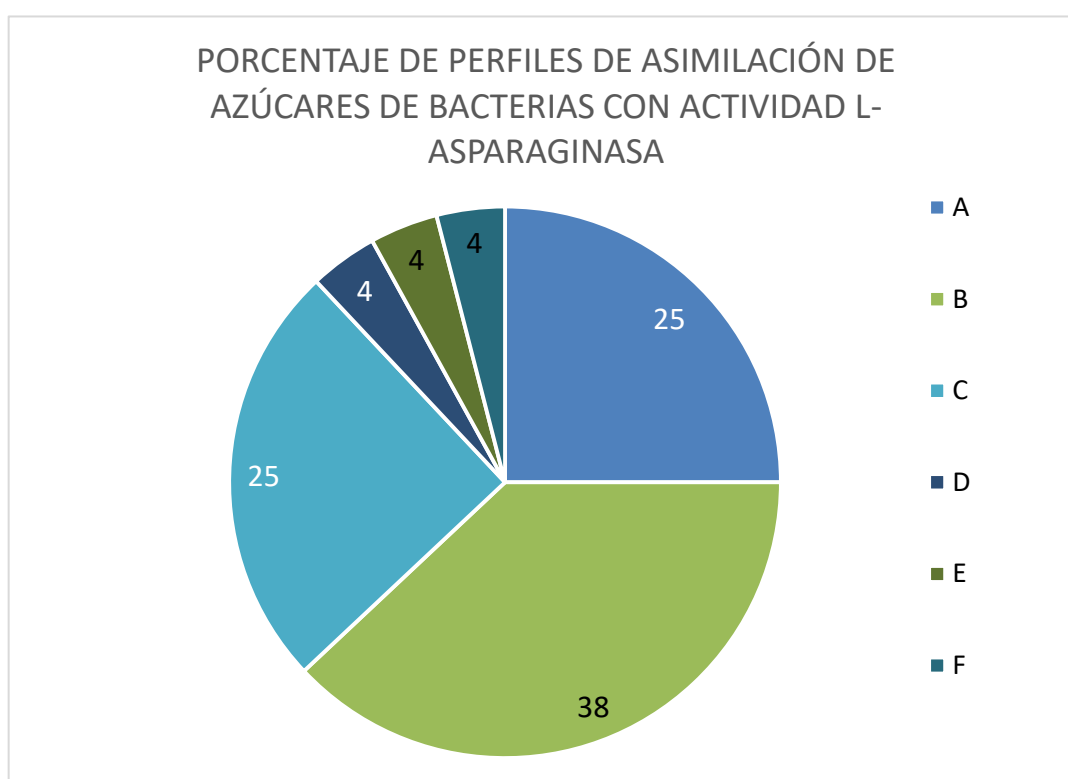


Figura N° 11. Distribución de los perfiles fenotípicos de asimilación de azúcares de las bacterias aisladas de ambientes salinos.

4.2.3 Pruebas hidrolíticas

En la tabla N° 9 se presenta 11 perfiles fenotípicos de hidrólisis de sustratos a partir de los 24 aislados bacterianos, se observa que el 8 % de los aislados tienen la capacidad de hidrolizar todos los sustratos del ensayo. Por otro lado, el 16 y 38 % de los aislados tuvieron la capacidad de hidrolizar cuatro y tres sustratos, respectivamente.

Tabla N° 9. Capacidad hidrolítica de diferentes sustratos por bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Perfiles Fenotípicos	Sustratos					Total	Cepas
	CMC	Almidón	Skim milk	tributirina	ADN		
A	+	+	+	+	+	2	CH11 y P2
B	-	-	+	-	-	2	M72 y M67
C	+	-	+	-	-	2	M54 y P17
D	+	-	+	-	+	2	M57 y P23
E	+	+	+	-	-	5	M62, P31, P6, M76 y P7
F	+	+	+	-	+	2	M75 y P20
G	-	+	+	-	-	4	M55, M64, P13 y M84
H	-	-	+	+	-	1	P16
I	+	+	+	+	-	2	P19 y M68
J	-	+	+	-	+	1	P4
K	-	-	+	+	+	1	M74

(+), hidrólisis y (-), no hidrólisis; CMC, carboximetilcelulosa.

En la figura N° 12 se observa que de los 24 aislados bacterianos, el 63 % (15/24) hidrolizó carboximetilcelulosa, 67 % (16/24) almidón, 100 % (24/24) skim milk, 25 % (6/24) tributirina y 33 % (8/24) ADN.

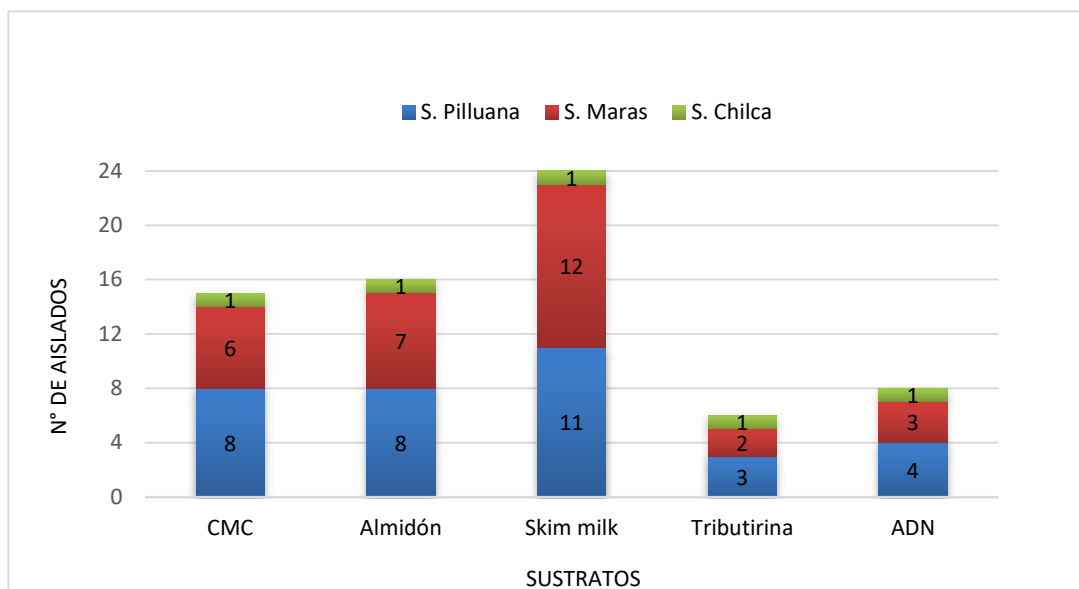


Figura N° 12. Actividad hidrolítica de diferentes sustratos por bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana. Maras v Chilca.

4.2.4 Pruebas bioquímicas y microbiológicas

En la tabla N° 10, se observa que de los 24 aislados bacterianos, el 42 % (10/24) son bacilos Gram (-), 50 % (12/24) bacilos Gram (+) y 8 % (2/24) cocos Gram (+). Asimismo, el 88 % (21/24) son catalasa (+), 75 % (18/24), H₂S (+), 4 % (1/24) movilidad (+), 38 % (9/24) gas (+), 88 % (21/24) fermentan y oxidan la glucosa y el 12 % (3/24) solo oxidan la glucosa.

Tabla N° 10. Cuadro resumen de los ensayos bioquímicos y microbiológicos de los aislados bacterianos productores de L-asparaginasa de las Salinas de Maras, Pilluana y Chilca.

Características	CH11	M54	M84	M62	M75	M55	M74	M72	M67	M68	M57	M64	M76	P4	P17	P19	P23	P31	P20	P7	P16	P13	P6	P2
Morfología celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Coco	Bacilo	Coco
Tinción Gram	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H₂S	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Gas	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
O/F (glucosa)	O/F	O/F	O	O/F	O/F	O/F	O	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O	O/F	O/F	O/F

4.2.5 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

En la tabla N° 11 se detalla siete perfiles de sensibilidad antimicrobiana de los aislados bacterianos con actividad L-asparaginasa. Los perfiles predominantes dentro de los 24 aislados son B, C y A en 38, 33 y 13 %, respectivamente. Asimismo, los perfiles D, E, F y G presentaron el 4 % cada uno.

Tabla N° 11. Perfiles de sensibilidad presuntiva antimicrobiana de los aislados bacterianos productores de la L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Perfiles fenotípicos de sensibilidad antimicrobiana	A	B	C	D	E	F	G
Cloranfenicol	+	+	+	+	-	+	+
Ampicilina	-	-	+	-	-	+	-
Ac. Nalidíxico	+	+	+	-	+	-	+
Gentamicina	-	+	+	+	+	-	-
Levofloxacino	+	+	+	-	+	-	-
N° Cepas	3	9	8	1	1	1	1
%	13	38	33	4	4	4	4
Cepas	CH11, M62, P6	M54, M75, M72, M64, M76, P4, P17, P23, P13	M68, M84, M67, M57, P19, P20, P16, P2	M55	M74	P31	P7

Leyenda: +, Sensible (Presencia de halos); -, Resistencia (No presencia de halos)

4.3 Caracterización genotípica de las bacterias con actividad L-asparaginasa

4.3.1 Extracción de ADN genómico

De los 24 aislados, se extrajo y purificó el ADN genómico de los 15 aislados que presentaron características muy diferentes. En la figura N° 13 se presenta el ADN genómico marcado con una flecha de los aislados P16, P20, P23 y CH11, la variación en las intensidades de las bandas o manchas se debe a la naturaleza de cada aislado.

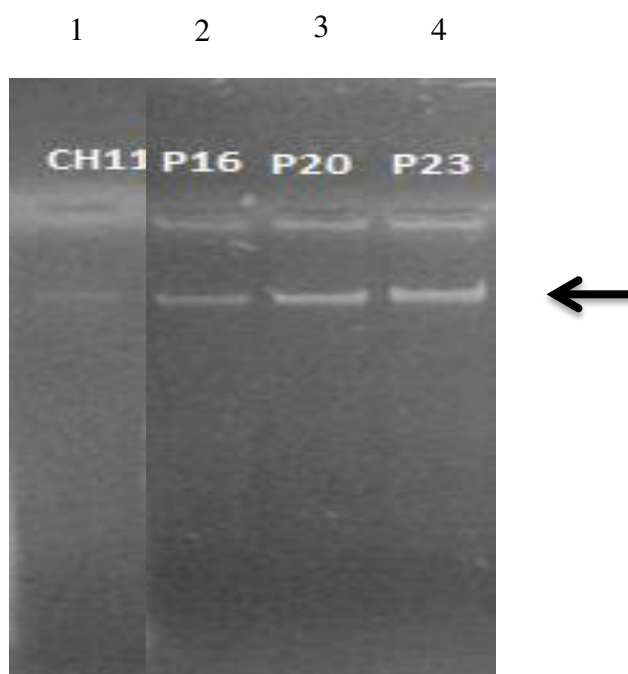


Figura N° 13. Gel de agarosa al 0,8 % con ADN genómico extraído de aislados de Pilluana y Chilca con actividad L-asparaginasa. Línea (aislado): 1, CH11; 2, P16; 3, P20; 4, P23.

4.3.2 Amplificación de los genes ribosómicos 16S

En la amplificación de los genes ribosómicos 16S se obtuvieron productos de aproximadamente 1400 pb. En la figura N° 14 se observa que todos los productos de PCR muestran la misma intensidad, lo cual indica que la cantidad de ADN molde y reactivos fueron óptimos.

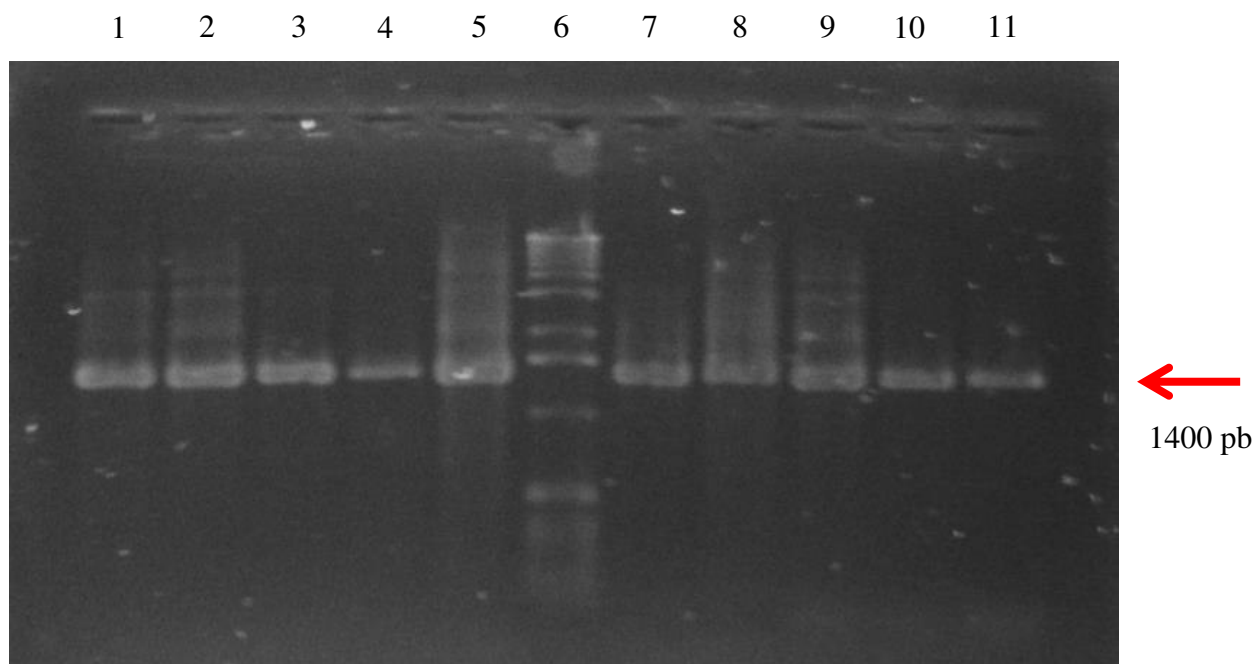


Figura N° 14. Genes ribosómicos 16S amplificados por PCR de las bacterias con actividad L-asparaginasa en gel de agarosa al 1%. Líneas (1 al 5 y 7 al 11) aislados, línea (6) Marcador DNA ladder 1 kb.

4.3.3 Secuenciación de los genes ribosómicos 16S y análisis bioinformático

De los 24 aislados con actividad L-asparaginasa se secuenciaron los genes ribosómicos 16S de los aislados M54, M62, M64, M68, M84, CH11, P7, P16, P20, P19, P31, P2, P23, P17 y P6. Se compararon las secuencias empleando el programa BLASTn donde se contrastaron las secuencias de nuestros aislados con las de los genes ribosómicos 16S de bacterias depositadas en la base de datos del GeneBank del NCBI. Estos aislados presentaron alto grado de similitud con especies del género *Bacillus* principalmente, también se obtuvieron *Halomonas* y *Enterobacter* (tabla N° 12).

Tabla N° 12. Identificación molecular de los aislados de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Grado de hidrólisis de L-asparagina	Aislado	Similitud (%)	Mejores hits en BLASTn	Identificación
Mayor	P7	99	<i>Bacillus marisflavi/aquimaris</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	P19	99	<i>Bacillus subtilis/licheniformis/tequilensis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	M54	97	<i>Halomonas huangheensis/cupida</i>	<i>Halomonas sp.</i>
	M62	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens/velezensis/siamensis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	M64	100	<i>Bacillus velezensis/tequilensis/subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	M68	99	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
Menor	CH11	99	<i>Bacillus vallismortis/velezensis/subtilis/tequilensis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	M84	99	<i>Bacillus subtilis/tequilensis/velezensis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	P20	99	<i>Bacillus licheniformis/flexus/aerius</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	P6	99	<i>Bacillus licheniformis/flexus/aerius</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	P16	99	<i>Enterobacter hormaechei/asburiae/xianqfangensis/cloacae</i>	<i>Enterobacter sp.</i>
	P17	99	<i>Enterobacter hormaechei/asburiae/xianqfangensis/cloacae</i>	<i>Enterobacter sp.</i>
	P23	99	<i>Enterobacter cloacae/hormaechei/xianqfangensis</i>	<i>Enterobacter sp.</i>
	P31	97	<i>Bacillus subtilis/licheniformis/tequilensis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
	P4	99	<i>Bacillus subtilis/tequilensi/velezensis</i>	<i>Bacillus sp.</i>

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio ha sido seleccionar bacterias con actividad L-asparaginasa provenientes de ambientes hipersalinos y posteriormente caracterizarlos fenotípica y genotípicamente.

Este estudio contribuye a describir la diversidad microbiana de ambientes salinos de la costa, sierra y selva, específicamente de las salinas de Chilca, Maras y Pilluana, respectivamente (69)

El medio nutritivo utilizado para la selección de bacterias productoras de L-asparaginasa fue preparado de acuerdo a lo descrito por Gulati *et al.*, 1996 en un estudio denominado *Ensayo rápido en placa para detectar microorganismos productores de L-asparaginasa*, donde evaluaron los componentes del medio con diferentes concentraciones de rojo de fenol (0,001; 0,003; 0,005; 0,007 y 0,009 %) y el diámetro o extensión de la zona de hidrólisis. Este ensayo se repitió para NaNO_3 y L-asparagina. Se observó que a la concentración de 0,009 % de rojo de fenol en ambos sustratos no afectaba el crecimiento colonial. Sin embargo, al usar como sustrato a la L-asparagina se formaba zonas rosadas de mayor dimensión. También se determinó el coeficiente de correlación (r) entre el área de la zona de hidrólisis (cm) y la actividad enzimática (UI/mL) en bacterias y hongos resultando 1,08 y 0,97, respectivamente; lo que significa, que existe una relación directa entre ambos factores (60). Por otro lado, Mahajan y col, 2013 realizaron un estudio comparativo empleando como matriz la fórmula de Gulati pero cambiando el indicador, se comparó el rojo de fenol y azul de bromotimol (BTB) en medios semisólido y líquido, el cual resultó favorecer el rojo de fenol en medio semisólido mostrando zonas de hidrólisis rosadas y el azul de bromotimol en medio líquido dando una mayor claridad de los niveles de hidrólisis de la L-asparaginasa por la variedad de tonalidades que presentaba (70). Pradhan y col, 2013 utilizaron la misma metodología con el medio M-9 modificado con rojo de fenol para seleccionar a las cepas más productoras de L-asparaginasa, la actividad más alta fue 23,8 UI/mL (40). Kulkarni y col, 2016, realizaron estudios sobre la optimización en la producción de L-asparaginasa de bacterias endofíticas empleando el medio M-9 modificado con rojo de fenol, el cual les permitió seleccionar a los que presentaban mayor hidrólisis (71). Aproximadamente, el 90 % de los estudios de investigación emplearon el medio

M-9 modificado con rojo de fenol para seleccionar bacterias productoras de L-asparaginasa. De las 106 bacterias aisladas de las salinas se obtuvieron 24 con actividad L-asparaginasa utilizando el medio semisólido descrito por Gulati. Asimismo, para diferenciar los aislados que presentaban mayor y menor actividad enzimática se utilizó la misma cantidad de bacterias, de esta manera se observó cuales hidrolizaban altamente la L-asparagina, para ello se empleó la misma fórmula descrita por Gulati en medio líquido. De los 24 aislados, el 50 % presentó tonalidades entre N° 4 y 5, esto indica una óptima y buena actividad L-asparaginasa, estos aislados fueron M62, M55, M72, M57, M64, P7, P13, M54, M68, M67, M76 y P19.

En la evaluación de las pruebas microscópicas se observó que de los 24 aislados, 50 % fueron bacilos Gram (+), 42 % bacilos Gram (-) y 8 % cocos Gram (+). Estudios sobre la diversidad bacteriana de origen hipersalino reportan resultados similares donde predominan los bacilos Gram (+) tales como el de Alireza y col, 2011 que obtuvieron 32 aislados del lago salado de Maharloo en Irán, de los cuales 25 fueron bacilos Gram (+), tres bacilos Gram (-), dos cocos Gram (+) y dos arqueas. Estos fueron identificados como *Bacillus subtilis*, *B. endophyticus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. amyloliquefaciens*, *B. vallismortis*, *B. aquimaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Paenibacillus* sp., *Aeromonas veroni* y *Chryseobacterium taeanese* (49). Asimismo, Rohban y col, 2009 aislaron 231 bacterias halófilas moderadas y 49 halófilas extremas aisladas del lago hipersalino de Howz Soltan en el centro de Irán, encontraron 172 aislados bacilos Gram (+), 52 cocos Gram (+) y 56 bacilos Gram (-). Se identificaron los géneros *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Salinicoccus* y *Piscibacillus* (72). Sin embargo, existen otros estudios donde predominaron los bacilos Gram (-), así Biswas y col, 2013, estudiaron 12 bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las salinas solares de Orissa, India. De las cuales, el 75 % fueron bacilos Gram (-) y 25 % bacilos Gram (+) (39). Ello indica que el grupo predominante es heterogéneo y esta constituido por bacilos Gram (+) y otras formas microscópicas.

Respecto a las propiedades fisiológicas de bacterias provenientes de ambientes hipersalinos algunos investigadores como Biswas y col, 2013 reportaron que de 12 bacterias con actividad L-asparaginasa, ocho crecían de 28 a 45 °C y cuatro de 28 a 37 °C; la temperatura óptima de crecimiento fue de 28 °C en seis bacterias, 32 °C en cuatro y 37 °C en dos. Para el rango de pH, siete bacterias crecían a pH de 5 a 10 y cinco bacterias de 5 a 11; el pH óptimo de crecimiento fue 7 en todas las bacterias. En el rango de sales, ocho bacterias crecían de 0 a 20 % de sales, dos de 5 a 20 %, una de 0 a 15 % y otra de 5 a 35 %. La concentración de sales óptima fue de 5 % en nueve bacterias; 2,5 % en dos y 15 % en una (39). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por las bacterias provenientes de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca, los cuales en la tolerancia de temperatura se observó que el 71, 96 y 100 % tuvieron un crecimiento alto a 20, 30 y 37 °C, respectivamente. Por otro lado, a 42 °C solo el 8 % de los aislados presentó un crecimiento alto. Por lo tanto, las temperaturas con mejores resultados fueron 30 y 37 °C. En el ensayo de pH se observó que el 88 % de los aislados presentaron un crecimiento alto a pH 4, 6, 8 y 9. Por otro lado, a pH 7 el 100 % presentaron un crecimiento alto. En el ensayo de tolerancia salina se observó que el 96 % de los aislados crecieron a 0,9; 5 y 10 % de sales, esta capacidad de crecimiento a bajas y altas concentraciones salinas indica que son bacterias halotolerantes, solo el 4 % (1/24) fue halófila moderada debido a que creció únicamente a 5 y 10 % de sales. Por otro lado, en la evaluación al 15 % de sales, el 63 % de los aislados presentaron un crecimiento alto, cabe destacar que todas las bacterias aisladas de las salinas de Maras mostraron esta capacidad. En la evaluación al 20 % de sales, el 67 % de los aislados no crecieron y el 33 % presentaron solo un crecimiento regular. Contar con microorganismos que crecen en un amplio rango de sales, pH y temperatura, es ventajoso en producción a gran escala, ya que a diferencia de las bacterias comerciales, estas no se restringen a crecer únicamente a un determinado parámetro, y cualquier cambio de estos que se produzcan en el sistema no afectaría el crecimiento de las bacterias, por la gran capacidad de adaptación que presentan (50).

En las pruebas nutricionales se observó que los aislados bacterianos presentaron características similares entre sí, por ello se consideró agruparlos

en seis perfiles. El perfil con mayor número de azúcares asimilados fue el “A” con cuatro azúcares (glucosa, lactosa, maltosa y fructosa) constituyendo el 25 % de los aislados. Sin embargo, el perfil “B” con dos azúcares fue el grupo con mayor número de aislados. El 100 y 92 % de los aislados asimilaron la glucosa y fructosa, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Moorthy y col, 2010 que estudiaron la utilización de azúcares de una cepa de *Bacillus* sp. productora de L-asparaginasa, observaron que tenía la capacidad de asimilar diversos azúcares entre ellos la glucosa, galactosa, arabinosa y sucrosa (43). Igualmente, Biswas y col, 2013, reportaron 12 bacterias con actividad L-asparaginasa, el 58 % asimilaban la maltosa, el 25 % la lactosa y el 100 % la glucosa y fructosa (39). Por otro lado, diferentes estudios de microorganismos de ambientes hipersalinos reportaron la capacidad de asimilar diferentes azúcares. Así, Yoon y col, 2003 estudiaron una cepa del *Bacillus marisflavi* aislada del mar amarillo en Corea, esta asimiló 11 azúcares (fructosa, glucosa, maltosa, celobiosa, manitol, manosa, melibiosa, ribosa, sucrosa, trehalosa y xilosa) (73). Estos microorganismos a nivel industrial presentan un gran potencial debido a que sus requerimientos nutricionales son adaptables a una diversidad de fuentes.

Es importante valorar a los microorganismos que presentan actividades hidrolíticas combinadas ya que podrían ser de gran interés para diversas aplicaciones industriales. Por ello, además de identificar la actividad L-asparaginasa se analizaron otras actividades hidrolíticas en cinco sustratos. En las pruebas hidrolíticas se observó que el 100 % de los aislados hidrolizaban la caseína, el 67 % almidón, el 63 % carboximetilcelulosa, el 25 % tributirina y el 33 % ADN. Asimismo, los aislados CH11, P2 hidrolizaron todos los sustratos, seguido de los aislados M75, P20, P19 y M68 que hidrolizaron cuatro. Un estudio realizado por Pallavi y col, 2014 demostró que las bacterias aisladas de los suelos de Nizampatnam, India tenían la capacidad de hidrolizar el almidón además de la L-asparagina (74). Asimismo, Jahanvi y col, 2018, reportaron que de 30 aislados procedentes de diversos lugares como el suelo marino Dumas, lago Garden, entre otros, en la India. El 67 % hidrolizó la caseína y gelatina, adicional a la L-asparagina (75). Biswas y col, 2013 detectaron la cepa DPS01 que además de presentar actividad L-asparaginasa, también hidrolizó almidón,

caseína, gelatina, glutamina y Tween 80, esta bacteria fue aislada de las salinas solares de Orissa, India (39).

En el estudio genotípico se secuenció el gen ribosómico 16S de 15 aislados, los cuales resultaron pertenecer a los géneros *Bacillus*, *Halomonas* y *Enterobacter*. Cabe mencionar que estos resultados son similares con estudios de bacterias productoras de L-asparaginasa aisladas de ambientes hipersalinos, así están los reportes de Sindwad, Khadiga, Sherifahy, Alireza, Shirazian para el género *Bacillus*, Sudha para *Enterobacter* y Mahmood para *Halomonas*.

Sindhwad y col, 2015 aislaron siete bacterias con actividad L-asparaginasa de los sedimentos marinos de Maharashtra, India. Emplearon el método descrito por Gulati, la bacteria con mayor actividad L-asparaginasa fue caracterizada como *Bacillus pumilus* (50). Khadiga y col, 2013 aislaron 60 bacterias extraídas de los suelos salinos de Qalubia y Sharkia, Egipto. Solo dos bacterias produjeron L-asparaginasa y fueron identificadas como *Bacillus subtilis* y *B. marisflavi* (45). Alireza y col, 2011 recolectaron muestras de sedimentos y agua de diferentes partes del lago salado de Maharloo en el sur de Shiráz, Irán. Aislaron 11 bacterias con actividad L-asparaginasa, de los cuales el aislado BCCS 034 mostró una alta actividad en el sobrenadante. En la caracterización fenotípica tomaron como referencia el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey donde se encuentra de forma estándar la descripción de todas los géneros y especies bacterianas y mostró relación con el género *Bacillus* sp. Y en la secuenciación del gen ribosómico 16S, presentó similitud con *Bacillus* sp. en un 99 % (49). Shirazian y col, 2016 aislaron 85 bacterias del Lago Salado de Urmia, India; de las cuales 16 presentaron actividad L-asparaginasa, mediante el análisis de secuencia del gen ribosómico 16S mostraron pertenecer a los géneros *Bacillus* y *Salicola*, bacterias halotolerante y halófila, respectivamente (6). Sherifahy col, 2015 aislaron seis bacterias con actividad L-asparaginasa recolectados de los suelos de Ibadan, Nigeria. Estos aislados fueron identificados como *Bacillus firmus*, *Streptococcus* sp. D1, *Streptococcus* sp. D2, *Bacillus polymyxa*, *B. circulans* y *Paenibacillus validus*, respectivamente (76). Estos resultados indican que gran parte de la familia del género *Bacillus* aisladas de ambientes hipersalinos representan gran potencial en dos aspectos, primero por ser altamente probable que la L-asparaginasa producida presente mejores

características inmunológicas que las comerciales, debido a que provienen de ambientes extremos convirtiéndolas en microorganismos diferentes y únicos del resto de las procariotas. Y segundo porque presenta la posibilidad de ser excelentes productores de L-asparaginasa, solo bastaría determinar los parámetros que predispongan su gran producción.

Actualmente se cuenta con escasos reportes respecto a la actividad L-asparaginasa en la familia *Enterobacter* de ambientes hipersalinos. Sin embargo, Sudha y col, 2016 aislaron 98 bacterias de muestras de *Sardinella longiceps* (Sardina) y *Rastrelliger kanagurta* (caballa); el aislado que presentó mayor actividad fue identificado como *Enterobacter hormaechei*, bacteria halotolerante (77).

Respecto a la familia *Halomonas*, Mahmood y col, 2017 analizaron muestras de nueve lagos salados (Aran va Bidgol, Hoze Soltan, Damghan, Khur, Selkenoon, Golestan, Shoor Mast, Shourabil y Urmia), cuatro humedales (Ajigol, Alagol, Almagol y Gomishan), dos manantiales de salmuera (Abhar y Kal Shoor) y dos desiertos (Maranjab y Mesr), de estos ambientes aislaron 120 bacterias halófilas, de las cuales 38 presentaron actividad L-asparaginasa con un valor promedio de 2.0 U/mL, estas pertenecían a los géneros *Halomonas* y *Aidingimonas*, bacterias halófilas (78). Las secuencias de los genes ribosómicos 16S presentaron similitud de 99 % con los géneros antes mencionados, respectivamente. Estos resultados indican que miembros del género *Halomonas* presentan actividad L-asparaginasa.

Por otro lado, en la secuenciación del gen ribosómico 16 S, los aislados P7, P19, P20, P6, P31, P4, M62, M64, M68, M84 y CH11, se identificaron como miembros del género *Bacillus*, los aislados P16, P17 y P23 del género *Enterobacter* y M54 del género *Halomonas*.

Después del análisis fenotípico del aislado M68, se observó que las características microscópicas, bioquímicas, nutricionales, hidrolíticas y de sensibilidad antimicrobiana presentaban cercana relación a las descritas para *Bacillus subtilis* indicadas en el estudio comparativo de Roberts y col, 1996 (79). Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en la comparación de la

secuenciación del gen ribosómico 16 S con 99 % de similitud para *Bacillus subtilis*. Las características fisiológicas concordaron en pH y concentración salina siendo de 5 a 9 y de 0,9 a 15 %, respectivamente. Sin embargo, en los rangos de temperaturas presentó diferencias, el aislado creció de 20 a 37 °C y de la referencia de 10 a 50 °C. Esta diferencia se justificaría por factores ambientales que predisponen esta característica, convirtiéndola en una cepa particular del *Bacillus subtilis* (80).

Según la caracterización genotípica de los aislados CH11 y P19, ambos indicaron tener 99 % de similitud con *Bacillus tequilensis*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*. En las pruebas microscópicas e hidrolíticas compartían los mismos resultados con las tres especies. Sin embargo, en las pruebas bioquímicas, nutricionales y sensibilidad antimicrobiana ambos aislados se relacionaban más con *Bacillus subtilis* (80). Esto fue porque *Bacillus tequilensis* a diferencia de ambos aislados no tiene la capacidad de asimilar la lactosa ni fermentar la glucosa. Igualmente, en la sensibilidad antimicrobiana, *Bacillus licheniformis* es negativo al ácido nalidíxico caso contrario ocurría con estos aislados.

Igualmente, el aislado P4 mostró mayor afinidad con *Bacillus subtilis* en las características fenotípicas pese a que en la caracterización molecular presentó 99 % de similitud con *Bacillus tequilesis* y *B. velezensis*. Cabe mencionar que el aislado P4 mostró ser bacilo Gram (+), catalasa positiva, oxida y fermenta la glucosa, no produce gas, hidroliza almidón, skim milk y ADN, asimila la glucosa, fructosa, maltosa y lactosa, es sensible al cloranfenicol y ácido nalidíxico. Crece en el rango de pH de 5 a 9, concentración salina de 0 a 15 % de sales. Sin embargo, el rango de temperatura del *Bacillus subtilis* es muy amplia de 10 a 50 °C y del aislado es más estrecho (40,80,81).

El aislado P31, de acuerdo al análisis de la secuencia del gen ribosómico 16S mostró 97 % de similitud con las especies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. tequilensis*. Sin embargo, de acuerdo a la tabla comparativa de estas especies reportado por Gatson y col. en el 2006 (82), se observó que las características fenotípicas del aislado P31 tenía estrecha relación con *Bacillus licheniformis* las cuales fueron bacilo Gram (+), catalasa positivo, oxidó y fermentó la glucosa, H₂S positivo, gas negativo; hidrolizó almidón y skim milk; asimiló glucosa,

fructosa y maltosa; mostró sensibilidad al cloranfenicol y ampicilina, fue negativo al ác. nalidíxico. Caso contrario ocurrió con *Bacillus subtilis* que mostraba sensibilidad al ác. nalidíxico y *Bacillus tequilensis* que no tenía la capacidad de fermentar la glucosa. Cabe mencionar que las características fisiológicas, del aislado P31 creció en amplio rango de concentración salina de 0,9 a 10 % de sales mostrando ser bacteria halotolerante moderada, a diferencia de lo reportado en *Bacillus licheniformis* que crece de 2 a 11 % de sales. Esta pequeña variación puede deberse a dos motivos, primero por factores ambientales que permitieron al aislado adaptarse a bajas concentraciones de sales, y segundo que se trate de una cepa particular de esta especie.

Por otro lado, tanto el aislado P31 y *Bacillus licheniformis* compartieron el mismo rango de pH de crecimiento. Sin embargo, la temperatura máxima de crecimiento fue particular en cada una, según lo reportado fue hasta 55 °C y lo obtenido 37 °C, estas diferencias puede deberse por los mismos motivos antes mencionados.

De acuerdo a la secuenciación del gen ribosómico 16S, el aislado P7 presento 99 % de similitud con *Bacillus aquimaris* y *B. marisflavi*. Por otro lado, Jung-Hoon y col, 2003 y Jae-Chan y col, 2006 (73,83) reportaron las características fenotípicas para ambas especies, donde se detectó una cercana relación entre aislado P7 y *Bacillus marisflavi*. Estos reportes también comparten con lo obtenido en las características fisiológicas donde el rango de sales, pH y temperatura de crecimiento son las mismas.

Los aislados M64 y M84, mostraron tener 99 % de similitud con tres especies *Bacillus velezensis*, *B. tequilensis* y *B. subtilis*. A nivel fenotípico ambos aislados comparten similares características, las cuales a la vez se acercan más a *Bacillus velezensis* que a las demás, esta comparación fue de acuerdo a lo reportado por Ruíz-García y col, 2005 (84). Sin embargo, no se puede afirmar que ambos aislados son los mismos, porque probablemente se traten de cepas distintas para la misma especie debido a que se detectó diferencias en dos ensayos, las cuales fueron producción de H₂S y fermentación de glucosa. Cabe mencionar que ambos aislados y *Bacillus velezensis* compartieron las mismas características de sensibilidad antimicrobiana como

ser sensible al cloranfenicol y ac. nalidíxico. Lo mismo ocurrió en las pruebas hidrolíticas, morfológicas y nutricionales.

El análisis fenotípico y genotípico del aislado M62 compartían características asociadas a *Bacillus siamensis* a pesar que en la secuenciación del gen ribosómico 16S indica también 99% de similitud con *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. velezensis*. Sin embargo, Sumpavapol y col., 2010 (85) presentaron las diferencias entre *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. siamensis*. Esto facilitó identificar el aislado M62 como una cepa de la secuenciación *Bacillus siamensis* sostenido también por el 99 % de similitud para esta especie. Incluso las características fisiológicas están relacionadas presentando un crecimiento favorable entre 0,9 a 14 % de sales, pH de 5 a 9 y temperatura de 4 a 37 °C.

Después del análisis de la secuencia del gen ribosómico 16S del aislado P20, los resultados mostraron que tenía 99 % de similitud con *Bacillus licheniformis*, *B. flexus* y *B. aerius*. Por otro lado, se tiene conocimiento que género *Bacillus* está conformado en su mayoría por diversas especies heterogéneas de bacilos aeróbicos y anaeróbicos facultativos que se encuentran distribuidos en el ambiente (80). Sin embargo, para este caso según las características fenotípicas obtenidas, el aislado P20 no utiliza la glucosa bajo condiciones anaeróbicas, es únicamente bacilo aeróbico. Las características fenotípicas concuerdan con las reportadas por Chandna y col, 2013 (86) para el *Bacillus flexus*. Tanto la especie de referencia como el aislado P20 comparten la temperatura y concentración salina máxima de crecimiento, 37 °C y 10 % de sales, respectivamente. El pH para ambos fue el mismo de 4 a 9.

Caso particular ocurrió con el aislado P6, que según la secuenciación del gen 16S ADN_r mostró tener 99 % de similitud con *Bacillus flexus*, *B. aerius* y *B. licheniformis*, pero que en las pruebas fenotípicas no coinciden con las especies mencionadas sino con *Bacillus amyloliquefaciens*. Esto explica que las pruebas moleculares con un solo marcador no garantizan la identificación real, por ello es necesario utilizar mas de un cronómetro molecular para especies bacterianas que presentan cercanía taxonómica. Por ello, siempre se hace referencia a una

presunción o probabilidad nombrando como *Bacillus* sp. Cabe mencionar que la congruencia de los resultados fenotípicos entre el aislado P6 y *Bacillus amyloliquefaciens* son sostenidas por reportes de Lee y col, 2017 (87) y Fergus y col, 1988 (88).

El aislado M54 presentó 97 % de similitud con *Halomonas huangheensis* y *Halomonas cupida*. Sin embargo, después del análisis fenotípico se observó que compartían algunas características con *Halomonas cupida* y pocas con *Halomonas huangheensis* según Miao y col., 2014 (67). Las características que concordaban eran las nutricionales, fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e hidrolíticas, cosa que no ocurría con el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Estas diferencias se deben al bajo porcentaje de similitud y a la heterogeneidad del género *Halomonas*. Esto se sustenta en lo reportado por Mata y col, 2002 quienes describieron fenotípicamente mediante 243 ensayos a 21 especies de este género, las características del aislado M54 se parecen al de *Halomonas elongata* (61).

Los aislados P16, P17 y P23 pertenecen al género *Enterobacter* con 99% de similitud con *Enterobacter hormaechei*, *E. asburiae* y *E. xianqfangensis*. Las características fisiológicas indicaron que los tres aislados crecieron a concentraciones de 0,9 a 10 % de sales, a pH 7 y a temperaturas entre 20 y 37 °C. Los aislados P23, P16 y P17 mostraron ser bacilos Gram (-), los tres son catalasa positiva. En la elección de la fuente de carbono, las tres bacterias mostraron asimilar la glucosa, maltosa y fructosa. Sin embargo, la lactosa fue utilizada solo por P16 y P23. En las actividades hidrolíticas se observó que los aislados P17 y P23 mostraron la actividad celulolítica y proteolítica, el aislado P16 mostró actividad proteolítica y lipolítica. En la prueba de sensibilidad antimicrobiana, los aislados P17 y P23 mostraron sensibilidad a todos los antimicrobianos excepto a la ampicilina 10 µg; el aislado P16 mostró sensibilidad a todos los antimicrobianos del ensayo. Trabajos de investigación relacionados con este género en ambientes hipersalinos son de acceso limitado, Tao Gu y col, 2014 (89) reportaron características bioquímicas y nutricionales poco convencionales. Sin embargo, un estudio de Sudha y col, 2016 que recolectaron muestras de *Sardinella longiceps* (sardina) y *Rastrelliger kanagurta* (Mackerel),

en el estado de Kerala, India. Identificaron molecularmente a un aislado Sp7 como *Enterobacter hormaechei* con 100 % de similitud, las características fenotípicas de este aislado fueron bacilo Gram (-), no formó esporas, produjo H₂S, fue catalasa y ureasa positiva, empleó el citrato, tuvo la capacidad de asimilar lactosa, sacarosa y dextrosa. Mostró actividad amilolítica y proteolítica. Crecimiento óptimo a 37 °C, pH 7 y 3 % de sales (halotolerancia). Estos resultados concuerdan con las características fenotípicas del aislado P23, por lo que probablemente este aislado sea *Enterobacter hormaechei* (77).

Las técnicas bioquímicas y moleculares, sobre todo en bacterias aisladas de ambientes particulares como los salinos, no son concluyentes debido a que se requiere utilizar marcadores moleculares adicionales. Cabe destacar que estos aislados además de presentar actividad L-asparaginasa, la mayoría de ellos mostró diversas actividades enzimáticas con potencial económico para muchas industrias tanto farmacéutica, alimentaria y biotecnológica.

La obtención de L-asparaginasa a partir de bacterias provenientes de ambientes hipersalinos podría ser una fuente potencial para la obtención de L-asparaginasa. Debido a que presentan requerimientos nutricionales mínimos y por la posibilidad de poseer mejores características farmacocinéticas debido a las condiciones fisiológicas peculiares que presentan estos microorganismos al soportar condiciones extremas (49).

6. CONCLUSIONES

1. Se seleccionaron 24 bacterias con actividad L-asparaginasa provenientes de las Salinas de Maras, Pilluana y Chilca, de las cuales 12 presentaron mayor actividad.
2. De los 24 aislados bacterianos seleccionados el 42 % fue bacilos Gram (-) , 50 % bacilos Gram (+) y 8 % cocos Gram (+). Asimismo, estas bacterias presentaron diversos perfiles hidrolíticos, nutricionales y de sensibilidad antimicrobiana.
3. Según la caracterización molecular basada en el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S, 15 aislados pertenecieron a los géneros *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. y *Halomonas* sp. De acuerdo a la caracterización fenotípica y genotípica de los 15 aislados, se observó relación cercana con *Bacillus subtilis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. marisflavi*, *B. siamensis*, *B. flexus*, *B. licheniformis*, *Enterobacter hormaechei* y *Halomonas elongata*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DasSarma S, Arora P. Halophiles. [Internet] Encyclopedia of life sciences. [cited 2001 July 10]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/227986286_Halophiles
2. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(2):504–544.
3. Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Springer-Verlag. 2001;5(2):73–83.
4. Maturrano AL. Caracterización de la microbiota de las Salinas de Maras; Un ambiente hipersalino de los Andes de Perú. [Tesis Doctoral] Alicante: Universidad de Alicante; 2004.
5. Flores-Fernández ML, Zavaleta AI, Chávez-Hidalgo EL. Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana San Martin Halotolerant bacteria with lipolytic activity isolated from Pilluana Salterns -San Martin. *Cienc e Investig.* 2010;13(2):87-91.
6. Shirazian P, Asad S, Amoozegar MA. The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-Asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI J.* 2016;15:268–79.
7. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *El Cáncer.* 2011;117(2):238–49.
8. Ward DM, Brock TD (1978) Hydrocarbon degradation in hypersaline environments.
9. Edgerton, ME, Brimblecome, P. Thermodynammics of halobacterial environments. *Can J Microbiol.* 1981;27:899-909.
10. Mcgenity TJ, Oren A. Hypersaline environments. En E.M. Bell, editor. *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival.* CAB International; 2016. p.402-429.
11. Litchfield, C. Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Met Plan Science.* 1998;33:813-819.
12. Flores ML, Zavaleta AI, Zambrano Y, Cervantes L, Izaguirre V. Bacterias

- halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interes biotecnológico. *Cienc e Investig*. 2010;13(1):42–6.
13. Sovero G, Aguilar M, Caverro Y. Plan de Desarrollo Comunitario de la Localidad de las Salinas–Chilca. Guía. 2015.
 14. Ochoa N. Los piyapi yamorai o «gente del río de la sal». Los últimos proveedores de sal del Parapurus, Alto Amazonas, Perú. *Bull l'Institut français d'études Andin*. 2016;45(1):91–108.
 15. Beltran O. La producción de sal en la salineras de Maras (Cusco , Perú), del autoconsumo a la patrimonialización. *El Alfolí*. 2014;13:6-13.
 16. Niehaus F, Bertoldo C, Kähler M, Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51:711- 729.
 17. Van-Den BB. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:1-6.
 18. Kunte HJ. Osmoregulation in halophilic bacteria. *Extremophiles*. 2013;2:263–77.
 19. Rubiano-Labrador C. Análisis comparativo de la expresión de proteínas de *Tistlia consotensis* en respuesta a cambios en la salinidad externa. [Tesis de Doctorado] Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2014.
 20. González-Hernández JC, Peña A. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol*. 2002;44(3–4):137–56.
 21. Talluri VS, Bhavana M, Kumar MV, Rajagopal SV. L-Asparaginase: An Ultimate Anti-Neoplastic Enzyme. *Int Lett Nat Sci*. 2014;15:23–35.
 22. Verma N, Kumar K, Kaur G, Anand S. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Crit Rev Biotechnol*. 2007;27(1):45–62.
 23. Vanden BH. Asparaginase revisited. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(2):168–178.
 24. Ahlke E. Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamic control during induction therapy in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1997;96(4):675–81.
 25. Albertsen BK. Monitoring of Erwinia asparaginase therapy in childhood ALL in the Nordic countries. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(4):433–7.
 26. Appel IM. Lack of asparagine depletion in the cerebrospinal fluid after one intravenous dose of PEG-asparaginase: a window study at initial diagnosis of

- childhood ALL. Leukemia. 2003;17(11):2254–6.
27. Nambayan AG, Jude S. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). St Jud Child Res Hosp. 2008;13(2):1–19.
 28. Cachumba JM, Antunes FA, Peres GF, Brumano LP, Santos JC Dos, Da Silva SS. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. Brazilian J Microbiol. 2016;47:77–85.
 29. Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. Crit Rev Oncol Hematol. 2016;100:1–10.
 30. Kumar D, Sobha K. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. Adv Biores. 2012;3:137–57.
 31. Friedmann M. Über die Verbreitung asparagins paltender Organ fermente. Biochemistry. 1910;26:435–440.
 32. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Acrylamide:a cooking carcinogen. Chem Res Toxicol. 2000;13(6):517–522.
 33. Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M. Acrylamide formation mechanism in heated foods. J Agric Food Chem. 2003;51(16):4782–4787.
 34. Rodríguez–Valera F. The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton (FL): CRC Press; 1993;1-23.
 35. Mesas JM, Gil JA, Martin JF. Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. J Gen Microbiol. 1990;136:515–519.
 36. Mohamed SA, Elshal MF, Kumosani TA, Aldahlawi AM, Basbrain TA, Alshehri FA, et al. L-asparaginase isolated from Phaseolus vulgaris seeds exhibited potent anti-acute lymphoblastic leukemia effects in-vitro and low immunogenic properties in-vivo. Int J Environ Res Public Health. 2016;13(10):1–10.
 37. Mahabal NS, Kaliwal BB. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of L-Asparaginase from Soil Rhizosphere Fungus Aspergillus tamarii. J Gen Microbiol. 2017;4(5):30-4.
 38. Shaik M, Girija SG, Iswarya M, Rajitha P. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine Streptomyces parvulus strain sankarensis-A10. J Genet Eng Biotechnol. 2017;15(1):87–94.
 39. Jhuma B. Production of extracellular enzymes by halophilic bacteria isolated

- from solar salterns. *Pharm Technol.* 2013;4:30–6.
40. Pradhan B, Dash SK, Sahoo S. Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(12):936–41.
 41. Mangamuri U, Vijayalakshmi M, Ganduri VS, Rajulapati SB, Poda S. Extracellular L-Asparaginase from *Streptomyces labedae* VSM-6: Isolation, Production and Optimization of Culture Conditions Using RSM. *Pharmacogn J.* 2017;9(6):932–41.
 42. Savani AV, Parmar PR, Cotton M. Screening and Partial Purification of L-Asparaginase from the Bacteria Isolated from Soil Samples. *J Gen Microbiol.* 2017;6(9):784–92.
 43. Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya RT. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus sp.* *African J Microbiol Res.* 2010;4(18):1862–7.
 44. Singh HR, Jha SK. Microbial L-asparaginase: present and future prospective. *Int J Innov Res Sci Eng Technol.* 2013;2(11):7031–51.
 45. Aboutaleb KA, Ebeed NM. L-Asparaginase Synthesis by some Egyptian Bacterial Isolates and Molecular Identification Based on the 16S rRNA Sequence. *Middle East J Appl Sci.* 2013;3(4):231–43.
 46. Bhat MR, Nair JS, Marar T. Isolation and identification of L-asparaginase producing *Salinicoccus sp.* MKJ997975 from soil microbial flora. *Int J Pharm Sci Res.* 2015;6(8):3599–605.
 47. Print I, Online I, Rudrapati P, Audipudi AV. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* Avoidable childhood death: Exploring the potential of marine bioactive products of halophilic bacteria in cancer treatment. 2015.
 48. Trilokchandran B, Agrawal P, Krishna V. L-Asparaginase production. *J Environ Res Develop.* 2016;10(04):712-16.
 49. Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. L-Asparaginase Production by Moderate Halophilic Bacteria Isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian J Microbiol.* 2011;51(3):307–11.
 50. Sindhwad DK, Sindhwad P. Media Optimization, Isolation and Purification of L-Asparaginase from Marine Isolate. *Asian Pac J Heal Sci Asian Pacific.* 2015;2(23):8260–72.

51. Lake L, District B, Ashish C, Manish B. Isolation and Characterization of L-asparaginase producing isolate from. *Res J Recent Sci*. 2014;3:38–41
52. Babalola OO. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African J Biotechnol*. 2003;2(12):710–3.
53. Chan SH, Stoddard BL, Xu SY. Endonucleasas de corte natural y de ingeniería: desde el mecanismo de escisión hasta la ingeniería de la especificidad de las hebras. *Nucleic Acids Res*. 2011;9(1):1-18.
54. Ayala-Labarríos LA, Aguilar-González CN, Rocha-Revilla JC. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. *African J Biotechnol*. 2009;1:2-16.
55. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;2(5):70–8.
56. Cheriyaedath S. Técnica del Polimorfismo de Longitud de Fragmento (RFLP) de Restricción. *Res J Recent Sci*. 2006;4:1–4.
57. Mauricio J, Herrera M. Filogenia bacteriana mediante el análisis del RNAr 16S. [Internet] Mexico. [Cited 2007 January 01] Available from: <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Microbiologia/images/Documentos/filogenetica.pdf>
58. Altschul SF, Carroll RJ, Lipman DJ. Analysis of amino acid sequences. *J Mol Biol*. 1989;4:647–653.
59. Dyll-Smith M. The Halohandbook: protocols for halobacterial genetics. Mark Dyll-SmTith, Martinsried, Ger. 2008;3:1–144.
60. Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening [sc]L[/sc]-asparaginase producing microorganisms. *Lett Appl Microbiol*. 1997;24(1):23–6.
61. Rodríguez E. Bacteriología general : principios y prácticas de laboratorio. San José: Ed. Universidad de Costa Rica; 2016. 458 pp.
62. Canales-Mormontoy PE. Caracterización molecular de bacterias amilolíticas aisladas de las Salinas de San Blas- Junín. [Tesis de pregrado] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
63. Chavez-Hidalgo EC. Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana-San Martín. [Tesis de maestría] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.

64. Teather RM. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Indian J Microbiol.* 1982;43(4):777–80.
65. Sanchez-Porro C, Martin S, Mellado E. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Indian J Microbiol.* 2003;94(2):295–300.
66. Ventosa A, Quesada E, Rodriguez –Valera F, Ruiz-Berraquero F. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Indian J Microbiol.* 1992;128(9):1959–68.
67. Miao C, Jia F, Wan Y, Zhang W, Lin M. *Halomonas huangheensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline alkali soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64:915-20.
68. Mata JA. A Detailed Phenotypic Characterisation of the Type Strains of *Halomonas* Species. *Syst Appl Microbiol.* 2002;375:360–75.
69. Popovici GC. La importancia del estudio de las lagunas minero-medicinales del balneario de chilca Lima Peru. 2012;1–24.
70. Mahajan RV, Saran S, Saxena RK, Srivastava AK. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;341(2):122–6.
71. Joshi RD, Kulkarni NS. Isolation of L-Asparaginase Producing Endophytic Bacteria from Plants Recommended for Cancer Therapy. *El cáncer.* 2014;3(11):2012–5.
72. Rohban R, Amoozegar MA, Ventosa A. Detection and isolation of halophilic bacteria that produce extracellular hydrolysis of Lake Howz Soltan, Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009; 36(3):333-40.
73. Yoon JH, Kim IG, Kang KH, Oh TK, Park YH. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(5):1297–303.
74. Rudrapati P, Audipudi AV. Novel Anticancer enzyme from Marine Bacteria to fight against neoplastic cancer-Acute lymphoblastic leukemia. *Int J Sci Eng Res.* 2014;5(12):1276-85.
75. Vachhani J, Desai B, License A. Isolation, identification and production of L-asparaginase producing bacteria from soil. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;4(1):1-6.

76. Wakil SM, Adelegan AA. Screening , Production and Optimization of L-Asparaginase From Soil Bacteria Isolated in Ibadan. FEMS Microbiol Lett. 2015;39–51.
77. John R. Extracellular L-Asparaginase Production By Halotolerant Strain of *Enterobacter Hormaechei* Isolated From Marine Fishes. Int J Adv Res. 2016;5(1):2619–25
78. Barati M, Faramarzi MA, Nafissi-Varcheh N, Khoshayand MR, Tehrani MHH, Vahidi H, et al. L-asparaginase activity in cell lysates and culture media of halophilic bacterial isolates. Iran J Pharm Res. 2016;15(3):435–40.
79. Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. Isolated from Soil in Death Valley , California. Lett Appl Microbiol. 1999;49(3):1211-5.
80. Slepecky RA, Hemphill HE. The Genus *Bacillus*—Nonmedical. The Prokaryotes. Lett Appl Microbiol. 2006;4:530-562.
81. Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. J Microbiol Biotechnol. 1999;49 Pt 3:1211–5.
82. Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, Satomi M, Venkateswaran K, Hart ME, et al. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb , is closely related to *Bacillus subtilis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1475–84.
83. Lee J, Lim J, Park D, Jeon CO, Li W, Kim C, et al. *Bacillus seohaeanensis* sp. nov., a halotolerant bacterium that contains L -lysine in its cell wall. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1893–8.
84. Martı F, Ruiz-garcı C, Be V. *Bacillus velezensis* sp. nov ., a surfactant-producing bacterium isolated from the river. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55:191–5.
85. Sumpavapol P, Tongyonk L, Tanasupawat S, Chokesajjawatee N, Luxananil P, Visessanguan W. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60:2364–70.
86. Chandna P, Mayilraj S, Kuhad RC. *Bacillus paraflexus* sp. nov., isolated from compost. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63:4735–43.
87. Lee A, Cheng KC, Liu JR. Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic

potential. Plos one. 2017;12(8):1-21.

88. Fergus P, Michael G, Todd C. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. J Gen Microbiol. 1988;134:1847–82.
89. Tao C, Yan C, Li Y, Cheng G. *Enterobacter xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough , and reclassification of *Enterobacter*. Int J Syst Evol Microbiol. 2014; 64:2650–6.

ANEXO N° 1

Composición de Stock agua de Sales (SW) 30 % (g/L)	
NaCl	240,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	30,0 g
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	35,0 g
KCl	7,0 g
NaBr	0,8 g
NaHCO ₃	0,2 g
CaCl ₂	0,5 g
Agua destilada csp	1 L

ANEXO N° 2

Composición del medio M-9 modificado con rojo de fenol propuesto por Gulati.

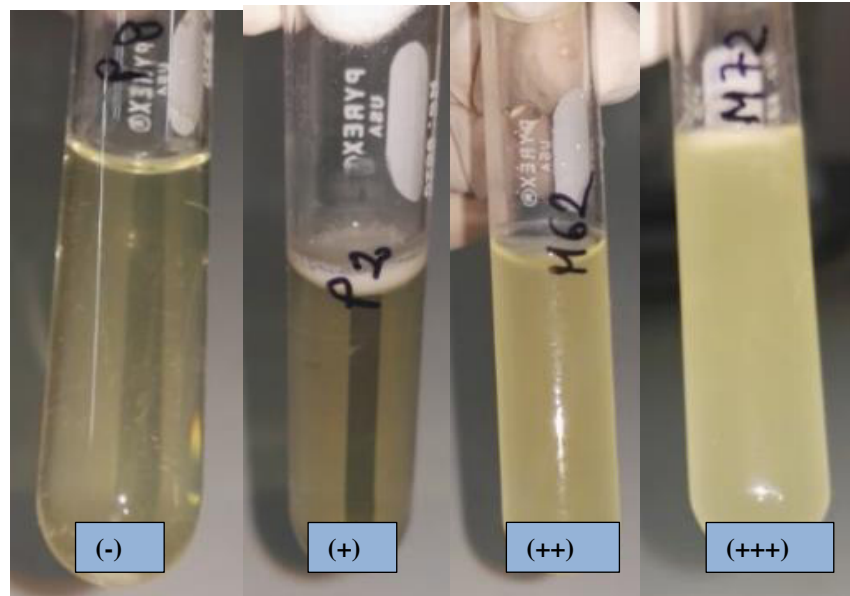
Composición de Medio-M9 Modificado (g/L)	
NaCl	0,5 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	6,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,001 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
Glucosa	2,0 g
L-asparagina	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada csp	1 L
Rojo de Fenol	0,009 %

ANEXO N° 3

Tabla del grado de hidrólisis de L-asparagina de las bacterias aisladas de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca.

Aislado	Grado de hidrólisis	Actividad L-asparaginasa
M62	5	Óptima
M55	5	Óptima
M72	5	Óptima
M57	5	Óptima
M64	5	Óptima
P7	5	Óptima
P13	5	Óptima
M54	4	Buena
M67	4	Buena
M68	4	Buena
M76	4	Buena
P19	4	Buena
M75	3	Mediana
M74	3	Mediana
P4	3	Mediana
P31	3	Mediana
P16	3	Mediana
P6	3	Mediana
P2	3	Mediana
CH11	2	Regular
M84	2	Regular
P23	1	Baja
P17	1	Baja
P20	1	Baja

ANEXO N° 4



Turbidez desarrollada por los aislados de las Salinas de Pilluana y Maras. Crecimiento:(+) Bajo, (++) Regular y (+++) Alto. Sin crecimiento (-)